
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIPHTÉRIE

(2^e MÉMOIRE),

PAR E. ROUX ET A. YERSIN.

Dans un mémoire publié en décembre 1888¹, nous avons établi que le bacille décrit d'abord par M. Klebs dans les fausses membranes croupales, et isolé ensuite par M. Loeffler, était la cause de la diphtérie. Inoculées à la surface des muqueuses excoriées des lapins, des cobayes, des pigeons, etc., les cultures pures de ce bacille produisent les fausses membranes caractéristiques²; injectées sous la peau, elles amènent la mort avec de l'œdème au point d'inoculation, une dilatation générale des vaisseaux, de la

1. Voir ces *Annales*, n° 12, 1888.

2. Chez les animaux comme chez l'homme, la gravité de la diphtérie ne se mesure pas à l'étendue des fausses membranes. Ainsi, un pigeon inoculé en excoriant un peu la muqueuse de la bouche avec un fil de platine chargé d'une 5^e culture du bacille de Klebs sur sérum, mourut en 3 jours, sans que l'on ait vu de fausses membranes dans la bouche. A l'autopsie, on ne trouva que quelques petites fausses membranes minces à la face inférieure de la langue et s'étendant un peu sur les côtés; elles avaient suffi à produire l'intoxication.

On produit de très belles fausses membranes chez le lapin en appliquant un petit vésicatoire à la face interne de l'oreille, et en ensemencant, sur la surface dépouillée d'épiderme, un peu de bacille diphtérique; en quelques heures, les fausses membranes sont bien développées. Il faut empêcher la plaie de devenir sèche et pour cela enfermer l'oreille dans un petit sac de caoutchouc sans comprimer les vaisseaux de la base. Le tissu de l'oreille devient très rapidement œdémateux. On peut arrêter le développement de la membrane croupale en découvrant l'oreille; la plaie se dessèche alors rapidement à l'air libre.

congestion des intestins et des reins. Chez le cobaye on trouve, en outre, presque constamment, de la rougeur des capsules surrénales et un épanchement séreux dans les plèvres; chez le lapin les plèvres ne contiennent pas de liquide, mais le foie est souvent le siège d'une dégénérescence graisseuse. Lorsque la mort ne survient pas trop rapidement, on observe sur les animaux des paralysies semblables à celles qui suivent la diphtérie chez l'homme. Le bacille diphtérique ne pullule pas dans les organes; on ne le trouve qu'au point d'inoculation, et même il disparaît complètement si la maladie se prolonge. La diphtérie est une intoxication causée par un poison très actif formé par le microbe dans le lieu restreint où il se développe. Nous avons donné la preuve qu'il en est ainsi en montrant que dans les cultures pures du bacille diphtérique il existe une substance chimique spéciale qui, introduite sous la peau des animaux, leur donne la maladie en l'absence de tout microbe vivant¹. A dose suffisante, elle amène une intoxication rapide, avec tous les symptômes et toutes les lésions qui suivent l'inoculation du bacille lui-même, la fausse membrane seule fait défaut. Les animaux qui reçoivent des doses plus faibles sont souvent atteints de paralysies diphtériques typiques.

La preuve de l'existence de ce poison et la reproduction expérimentale des paralysies diphtériques sont les résultats principaux de notre premier travail, qui a levé tous les doutes au sujet de la spécificité du bacille de MM. Klebs et Loeffler. Aujourd'hui nous voulons appeler l'attention sur quelques-unes des propriétés du poison de la diphtérie.

I

Nous rappellerons d'abord que les cultures du bacille de la diphtérie dans le bouillon de veau légèrement alcalin, deviennent acides dans les premiers jours et qu'elles prennent une réaction alcaline après un temps plus long². Tant que la culture est acide, son pouvoir toxique n'est pas considérable, et il est nécessaire d'injecter aux animaux une grande quantité de liquide filtré pour leur donner l'empoisonnement diphtérique aigu. Plus tard,

1. Le meilleur moyen pour séparer les microbes est la filtration sur porcelaine.

2. Lorsque les cultures sont laissées en repos à l'étuve à 30°-33°, il se forme au bout d'un certain temps une croûte légère à leur surface

lorsque la culture est alcaline, sa puissance toxique a beaucoup augmenté. Nous avons cité, dans notre mémoire de 1888, l'exemple d'une culture qui, filtrée sur porcelaine après 42 jours de séjour à l'étuve, avait fourni un liquide si actif que 1/5 de centimètre cube injecté sous la peau d'un cobaye le faisait périr en 30 heures. Ce résultat a été souvent reproduit avec des cultures de bacilles diphtériques virulents d'origines variées. Avec un liquide filtré après 30 jours, nous avons tué des cobayes en leur injectant 1/8 de c. c. seulement. Ce poison, si meurtrier pour les cobayes, les lapins et les petits oiseaux, agit aussi très énergiquement sur les moutons et les chiens. Chez ces derniers animaux, on peut produire soit l'intoxication diphtérique aiguë, soit lempoisonnement chronique avec paralysies caractéristiques.

Trois chiens du poids de 8 kilos, de 7 kilos et de 9 kilogr. 500, reçurent dans les veines 20 c. c., 10 c. c., 4 c. c. de liquide filtré. Ils succombèrent tous, le premier en 14 heures, le second en 15 heures, le troisième en 26 heures. Quelques heures après l'injection, ces chiens devenaient tristes, avaient des frissons, des vomissements et de la diarrhée, puis ils étaient incapables de se mouvoir et mouraient presque subitement. A l'autopsie on trouva une dilatation générale des vaisseaux sous-cutanés, une congestion de l'estomac, des intestins et des reins. L'estomac contenait un liquide bilieux et sanguin, l'intestin était rempli par un mucus rouge vineux, qui renfermait en grande quantité des cellules épithéliales de la muqueuse desquamée. L'urine était albumineuse et le sang noir et fluide¹.

Lorsque la dose injectée est plus faible, 2 c. c. par exemple, la maladie dure de 4 à 6 jours, l'animal maigrit beaucoup, ne mange pas, a des vomissements et de l'ictère. La muqueuse de

1. *Expérience.* — Le 16 janvier 1889, à 5 heures du soir, on injecte dans la veine du jarret droit d'un chien pesant 9 kilogr. 500 quatre centimètres cubes d'un liquide filtré très actif. Le 17 janvier au matin, le chien est couché, il frissonne et vomit des matières glaireuses. Dans la journée il a de la diarrhée, et il devient incapable de bouger. Il meurt à 7 heures du soir. — *Autopsie:* Dilatation générale des vaisseaux de la peau, des parois abdominales, des plèvres pariétales. Il n'y a pas de pleurésie ni de péricardite. L'estomac est vide d'aliments, la muqueuse est violacée et baignée par un liquide bilieux sanguin. L'intestin est rempli par un mucus rouge vineux chargé de l'épithélium de la muqueuse, dont les vaisseaux sont dilatés. Les reins sont violacés. La vessie rétractée contient un peu d'urine acide et très albumineuse. Le sang est noir et non coagulé.

la bouche, les conjonctives, la peau du ventre sont manifestement colorées en jaune, et les lésions sont plus intenses que dans les cas aigus. Elles consistent dans une distension des vaisseaux avec hémorragies multiples, un état cirrheux du foie et une altération des reins qui fournissent une urine albumineuse.

Les chiens de 7 à 10 kilos ne meurent pas en général si on leur injecte une quantité de liquide filtré inférieure à un centimètre cube. Ils restent longtemps tristes et affaiblis, ils deviennent paralysés du train de derrière, parfois de tout le corps, puis ils se rétablissent peu à peu.

L'expérience que nous citons en note¹ comme exemple est

1. Le 22 janvier, à 3 heures de l'après-midi, on injecte dans la veine du jarret droit de 3 chiens 2^{cc} (chien n° 1), 4^{cc} (chien n° 2), 1/2^{cc} (chien n° 3) d'un liquide filtré très actif. Le 23 aucun des chiens n'a mangé. Le n° 1 et le n° 2 sont très affaissés, ils ne répondent plus aux appels. Le 24 le chien n° 1 est manifestement plus malade; même état qu'hier pour le n° 2 et le n° 3. 25 janvier : les chiens 2 et 3 sont mieux. Le n° 1 reste obstinément couché. Le 26, ce chien a un ictere manifeste, teinte jaune de la peau, de la muqueuse buccale, des conjonctives. Il meurt le 28 janvier.

Autopsie du chien n° 4. — La peau de l'abdomen, les muqueuses sont jaunes. Le tissu cellulaire sous-cutané est jaune, il est semé d'une multitude de petites hémorragies. Le grand épiploon, le tissu cellulaire de l'abdomen et de la poitrine sont criblés d'hémorragies et colorés en jaune. Le foie est un peu rétracté et dur, il crie un peu sous le couteau. La vésicule n'est pas distendue et les canaux biliaires sont perméables. Les reins portent sous la capsule des hémorragies grandes et petites; ils sont durs, la substance corticale est rouge et parcourue par des trainées jaunes. La vessie contient une urine icérique et albumineuse. A la base du cœur, surtout sur le ventricule droit, il y a des hémorragies. La fibre du cœur est jaune.

Les chiens 1 et 3 sont restés longtemps malades, mangeant peu et devenant très maigres. Peu à peu ils se sont rétablis et au mois d'avril ils commencent à engraisser.

Le 4 mai on injecte de nouveau dans la veine du jarret droit de ces deux chiens 4^{cc} de liquide filtré qui amène la mort des cobayes à la dose 1/4 de c. c. Dès le lendemain les chiens sont tristes et ne mangent pas. Ils restent ainsi jusqu'au 12 mai où l'on remarque que le chien n° 2 a de la paralysie des quatre membres. Il marche avec la plus grande difficulté, les pattes postérieures écartées, les pattes de devant en dehors, il tombe sans cesse. Quand on l'excite à marcher, il fait quelques pas précipités les pattes écartées, puis il roule en avant, les pattes de devant faisant défaut. Il lui est impossible de monter la petite marche de son chenil, il a du tremblement des membres. Ces animaux restent dans le même état jusqu'au 16 mai. A cette date le chien n° 2 est presque complètement paralysé et se lève avec beaucoup de difficulté, ses jambes vacillent et il tombe fréquemment quand il essaye de faire quelques pas. Il a de fréquents tremblements dans les membres, et se plaint quand on le touche comme s'il avait une hyperesthésie générale. Une amélioration survient le 20 mai; les pattes antérieures

très intéressante, et montre combien la ressemblance est complète entre les paralysies diptériques expérimentales obtenues chez le chien et celles que l'on voit chez l'homme après la diphtérie naturelle. Chez le lapin les paralysies guérissent rarement, elles sont presque toujours progressives et aboutissent à la mort de l'animal. Il en est de même pour le cobaye. Le pigeon et le chien se rétablissent plus fréquemment ; c'est sur le chien qu'il faudra entreprendre l'étude de ces paralysies expérimentales, à cause de la facilité que l'on a chez cet animal pour explorer la sensibilité de la force musculaire.

Le chien, qui est sensible à l'action du poison diptérique, prend-il la diphtérie quand on l'inocule avec le bacille de Klebs ? Un chien vigoureux de 8 kilos succomba en trois jours à la suite de l'inoculation, faite sous la peau du thorax, d'une culture récente sur sérum. Il se produisit un gonflement œdémateux au point de l'injection, l'animal tomba bientôt dans la stupeur, devint incapable de faire un mouvement et mourut après une paralysie complète. Un autre chien inoculé avec la même

paraissent plus solides. Les jours suivants le mieux s'accentue, les pattes postérieures restent toujours très écartées pendant la marche, et il est impossible à l'animal de monter une marche même très basse. Le 29 mai, son train postérieur devient plus ferme, il monte un escalier peu élevé avec beaucoup de maladresse et en tombant. La patte postérieure droite est plus faible que la gauche. A partir de ce moment la guérison se fait rapidement, l'appétit devient meilleur. La marche reste encore un peu indécise à cause du peu de solidité du train de derrière. Elle est surtout difficile sur les terrains en pente. Au commencement de juin il marche et court sans tomber. Il tombe encore quelquefois quand il tourne brusquement, mais il peut être considéré comme guéri.

L'histoire du chien n° 3 est très semblable à celle du chien n° 2. Le 12 mai, c'est-à-dire 8 jours après l'injection de liquide filtré, il a de la paresse des membres antérieurs ; il est encore assez vif, mais il tombe quand il veut franchir le seuil très peu élevé du chenil, les pattes de devant font défaut et il roule en avant. Cette paralysie du train antérieur s'accentue les jours suivants en même temps qu'apparaît de la paralysie du train postérieur, surtout dans la patte gauche. Cet animal reste toujours couché, il faut le menacer pour le faire lever, et il ne peut faire que quelques pas incertains ; il est paraplégique, la patte gauche de derrière fléchit à chaque instant, l'appui sur les pattes de devant est un peu meilleur. Au commencement de juin ce chien fait quelques pas hors du chenil, sa marche est chancelante, et il faut le porter pour le faire rentrer dans sa niche. 10 juin : l'amélioration est considérable, il peut marcher ; seulement quand il veut aller un peu vite la patte gauche de devant fléchit et il tombe ; le train de derrière est encore vacillant, mais la guérison fait des progrès rapides. Ce chien se plaignait aussi quand on le touchait, au moment où sa paralysie était le plus complète. Ces deux animaux avaient des tremblements fréquents, ils secouaient fréquemment la tête pendant la maladie, il leur était impossible de se gratter avec leur patte de derrière.

culture dans la trachée n'éprouva aucune difficulté à respirer, mais il eut un gonflement du cou suivi d'une prostration profonde, et il succomba le 4^e jour complètement paralysé. A l'autopsie on ne trouva pas de fausses membranes dans la trachée. Ces deux animaux présentèrent avant leur mort un ictere très marqué. Les bacilles étaient peu abondants dans l'œdème rouge qui existait chez le premier chien au point d'inoculation, il n'y en avait pas dans le sang. Le microbe de la diphtérie peut donc se développer localement chez le chien et produire l'empoisonnement de l'animal.

Aucune expérience n'a été faite par nous pour savoir si le microbe de la diphtérie inoculé au mouton lui cause quelque maladie, mais un essai fait par M. Nocard à l'École d'Alfort montre que ce ruminant ne résiste pas au poison diptérique⁴. M. Nocard a injecté sous la peau d'un mouton 5^{cc} du liquide filtré qui a causé l'empoisonnement aigu des trois chiens dont nous avons rapporté tout d'abord l'histoire. Ce mouton a succombé en trois jours avec des accès de dyspnée.

Ces nouveaux exemples de l'action si énergique du poison diptérique sur le chien et le mouton font paraître encore plus surprenante la résistance des rats et des souris, qui supportent sans malaise des doses mortelles pour un chien de moyenne taille.

II

Nous avons avancé dans notre premier mémoire que le poison de la diphtérie devait être rapproché des diastases par quelques-unes de ses propriétés. En effet, il est modifié par la chaleur et d'autant plus profondément que la température est plus élevée et plus longtemps prolongée. Un liquide filtré, qui injecté sous la peau à la dose de 1/8 de c. c. tuait les cobayes, ne les fait plus mourir, même s'ils en reçoivent 1^{cc}, lors-

4. Le 30 janvier 1889, on injecte sous la peau d'un mouton adulte de taille moyenne, au niveau de l'encolure, 5^{cc} de liquide diptérique filtré. Le 31, l'animal a des tremblements dans tout le corps. Temp. 40°2. Le 1^{er} février, temp. 41°, le mouton paraît très affaissé. La respiration est très difficile. Le 2 la temp. est de 38°3. La dyspnée est extrême, la marche chancelante, la bête est indifférente à ce qui se passe autour d'elle. Mort dans la nuit du 2 au 3. *Autopsie*: Œdème sanguinolent au point d'injection. Vaisseaux distendus; épanchement dans le péricarde. Taches ecchymotiques sur le péricarde, l'endocarde, et sur la muqueuse intestinale.

qu'il a été chauffé 2 heures à 58°¹. Il n'est cependant pas absolument inoffensif, puisqu'il produit de l'œdème au point d'injection et tue facilement les petits oiseaux. Le même liquide porté pendant vingt minutes à 100°² peut être introduit dans les veines d'un lapin à la dose de 35cc sans lui causer aucun malaise immédiat, tandis qu'avant le chauffage 1/2cc en injection sous-cutanée ou intra-veineuse amenait sûrement la mort. Les animaux qui reçoivent dans les veines ou sous la peau de fortes quantités de liquide chauffé, et qui ne paraissent en éprouver tout d'abord aucun mal, finissent presque toujours par succomber au bout d'un temps plus ou moins long. Ils maigrissent lentement bien qu'ils mangent comme à l'ordinaire, et montrent des symptômes de paralysie, principalement dans les membres postérieurs, quelques jours avant leur mort³. La maladie dont ces animaux périssent rappelle tout à fait celle qui atteint les cobayes et les lapins auxquels on injecte de l'urine filtrée des diptériques ou des macérations d'organes de personnes mortes de diptérie infectieuse. Nous avons en effet recherché, si dans le corps des malades qui meurent de diptérie on ne trouvait pas le poison que nous avons découvert dans les cultures du microbe de cette maladie.

1. V. *Annales de l'Institut Pasteur*, décembre 1888, loc. cit.

2. Dans toutes ces expériences le liquide était chauffé au bain-marie dans des tubes scellés et presque remplis, afin d'éviter que l'action de l'air vienne s'ajouter à celle de la température. Le chauffage ne causait aucune coagulation dans le liquide, qui restait parfaitement limpide.

3. *Expérience*. — Le 22 novembre 1888, on injecte dans les veines d'un lapin 35cc d'un liquide filtré chauffé 20 minutes à 100°. Avant le chauffage, 1cc de ce liquide introduit dans le sang d'un lapin amenait la mort en 3 jours. Le lapin reste en bonne santé jusqu'au 29 novembre, puis il commence à maigrir; l'amagrissement continue bien que l'animal mange bien. Il meurt le 3 janvier. Il était paralysé des pattes de derrière depuis le 31 décembre. Aucune lésion apparente à l'autopsie, si ce n'est une diminution du volume des organes par suite de la maigreur.

Expérience. — Le 26 novembre 1888, on injecte dans les veines d'un lapin 35cc du liquide filtré employé le 22 novembre et chauffé 20 minutes à 100°. Ce lapin, qui va bien jusqu'au milieu de décembre commence à maigrir et meurt le 2 janvier 1889 dans un état de maigreur extrême. L'autopsie ne montre aucune lésion.

Expérience. — Le 22 novembre 1888, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 35cc d'un liquide filtré très actif chauffé 20 minutes à 100°. Le 23 novembre le cobaye est hérisse et frissonnant. Le 24 novembre il paraît plus vif. Il est trouvé mort le 27 novembre très amaigri : la seule lésion trouvée à l'autopsie est une dilatation des vaisseaux et une congestion intense des capsules surrénales.

Sur un enfant de cinq ans, mort pendant l'hiver d'une diphtérie infectieuse, nous avons enlevé la rate, nous l'avons broyée et mise à macérer dans de l'eau stérilisée pendant deux heures à basse température. Le liquide de macération a été filtré sur porcelaine¹. Un cobaye reçut sous la peau 8^{cc} du liquide filtré et un lapin 35^{cc} dans les veines. Le cobaye commença aussitôt à maigrir et mourut 5 jours après l'injection. Le lapin a survécu pendant 2 mois ; bien portant en apparence dans les premiers temps, il maigrit peu à peu et succomba après avoir été paralysé du train postérieur. Dans un autre cas de diphtérie très toxique², observé également en hiver chez un enfant, on recueillit de l'urine au moment où la prostration était la plus marquée, elle fut filtrée fraîche et injectée dans les veines d'un lapin et sous la peau d'un cobaye, suivant la méthode de M. Bouchard. Onze jours après, le cobaye était mort très amaigri ; le lapin était paralysé du train de derrière le 45^e jour

1. Le 29 novembre 1888, on injecte dans les veines d'un lapin 35^{cc} et sous la peau d'un cobaye 8^{cc} d'une macération de rate d'un enfant de 3 ans, mort dans la nuit du 27 au 28 d'une diphtérie infectieuse. La rate broyée est restée 2 heures dans 60^{cc} d'eau stérilisée à basse température. Le liquide de macération est filtré sur porcelaine, il est légèrement alcalin et parfaitement pur, puisqu'une portion laissée à l'étuve n'a pas donné de culture les jours suivants : c'est ce liquide filtré qui est injecté au cobaye et au lapin. Le 4 décembre le cobaye, qui a beaucoup maigrir, est trouvé mort le matin. *Autopsie* : ganglions des aines et des aisselles un peu gros et rouges. Congestion des capsules surrénales. Pas d'épanchement dans le péritoïne, ni dans les plèvres ; quelques suffusions sanguines dans le tissu cellulaire de l'abdomen le long des gros vaisseaux. On sème du sang du cœur, qui est noir et fluide. Ce sang reste stérile. Il faut noter que les lésions trouvées à l'autopsie de ce cobaye sont semblables à celles qui suivent l'injection des liquides diphtériques dont la toxicité est faible. — A partir du 10 décembre, le lapin commence à maigrir, il continue à manger mais s'affaiblit graduellement, il meurt le 28 janvier après avoir présenté d'abord de la parésie du train postérieur, puis de la paralysie véritable dans les deux derniers jours.

2. Le 2 décembre 1888, on injecte à un lapin dans les veines 33^{cc}, et à un cobaye sous la peau de l'abdomen 8^{cc} d'urine, filtrée sur porcelaine, rendue dans la journée par une enfant de sept ans et demi, atteinte de diphtérie à forme toxique et qui meurt le 7 décembre. L'urine ne contenait pas d'albumine ; elle était un peu acide. Le cobaye maigrit dès les jours qui suivent l'injection et il meurt le 13 décembre. Il est très émacié et à l'autopsie on ne trouve aucune lésion notable. On ensemence ses divers organes dans du bouillon qui reste stérile. Le lapin reste bien portant jusque dans les premiers jours de janvier, puis il maigrit, bien qu'il mange beaucoup. Le 16 janvier, on remarque que les pattes de derrière sont très faibles ; le lendemain, il a une véritable paralysie du train postérieur, qui le 20 janvier est étendue à tout le corps. Il meurt le 22 janvier très émacié. On ne trouve aucune lésion ; tous les organes sont diminués de volume à cause de l'émaciation.

après l'injection et il mourait le 51^e jour. Si l'on compare l'histoire de ces animaux à celle des cobayes et des lapins qui ont reçu la culture de diphtérie filtrée et chauffée, on sera convaincu que la cause de la mort est la même dans les deux cas. Le chauffage détruit une grande partie du poison, ou lui fait subir une modification analogue à celle qu'il éprouve dans l'organisme. Quoi qu'il en soit, il nous semble que les faits qui précèdent donnent une nouvelle preuve que le bacille de MM. Klebs et Loeffler est bien la cause de la diphtérie.

III

Conservées en vases clos, à l'abri de l'air et de la lumière, les cultures filtrées de diphtérie restent longtemps toxiques. Dans nos expériences, un liquide filtré était aussi actif après cinq mois que le jour où il avait été mis en tubes scellés. Il n'en est plus ainsi si le liquide est gardé au contact de l'air; peu à peu son pouvoir toxique diminue, et il faut pour tuer les animaux leur injecter des doses d'autant plus fortes qu'il est plus ancien. Cette action de l'air est très lente à l'obscurité; elle est plus rapide à la lumière solaire. Un liquide diptérique, qui à la dose de 1/8^e de c.c. fait périr un cobaye, est exposé à la lumière solaire dans des tubes clos sans air, et aussi dans des vases fermés seulement par un tampon de coton et où l'air pénètre librement. Après 2 heures d'insolation, 1^{cc} du liquide exposé à l'air tuait les cobayes avec un assez long retard; après 5 heures, injecté à la même dose, il causait à ces animaux seulement un peu d'œdème local. Au contraire, le liquide était resté très actif dans un tube clos laissé au soleil à côté des vases ouverts et pendant le même temps. Bien plus, 10 heures d'exposition en plein soleil n'avaient que très peu diminué le pouvoir toxique du liquide mis à l'abri de l'air. Dans ces essais, la température de l'intérieur des vases n'avait pas dépassé 32°. On sait que les diastases sont, elles aussi, rapidement modifiées par la lumière solaire au contact de l'air.

IV

Les cultures du bacille de la diphtérie n'ont des propriétés toxiques énergiques que lorsqu'elles sont devenues alcalines. Tant que la réaction est acide, il faut des doses notables de

liquide filtré pour produire un effet sur les animaux. La réaction alcaline du liquide est due sans doute à l'oxydation de la matière azotée du bouillon, car elle ne se produit pas dans des cultures faites à l'abri de l'air; de plus, dans les cultures anciennes, il se forme au bout de plusieurs mois des cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien. Nous ne saurions dire encore si l'ammoniaque est la seule base qui prenne naissance dans les cultures à l'air. Parmi les diastases, les unes agissent mieux en milieu alcalin et les autres en milieu acide: l'activité de la pepsine, par exemple, est très diminuée en présence d'un excès d'alcali, tandis que la diastase pancréatique au contraire est inactive dans un liquide acide. Le liquide diphtérique n'étant que peu toxique lorsque les cultures sont encore acides, nous nous sommes demandé si l'addition d'un acide à une culture alcaline diminuerait son pouvoir nocif. Nous avons ajouté à un liquide filtré très actif de l'acide lactique et de l'acide tartrique jusqu'à réaction franchement acide, et nous l'avons injecté à des cobayes. Deux cobayes qui ont reçu ainsi sous la peau 1^{cc} de ces liquides acidulés ont eu des œdèmes peu étendus, et se sont promptement rétablis; un cobaye témoin auquel on avait injecté 1/2^{cc} de la liqueur alcaline succombait rapidement avec les lésions ordinaires. Si on neutralise la liqueur inactive, elle recouvre une grande partie de son activité. Le poison diphtérique est d'autant plus atténué qu'il est resté plus longtemps en contact avec l'acide. L'addition d'acide phénique, d'acide borique, de bborate de soude au liquide toxique a retardé son action sur les animaux, sans toutefois empêcher leur mort. Il n'est pas nécessaire d'ajouter beaucoup d'acide pour diminuer l'énergie du poison de la diphtérie, des doses même très faibles ont une influence marquée. On conçoit qu'il faut étudier avec soin la façon dont la substance active est modifiée par les divers composés chimiques; on trouvera peut-être dans cette voie des indications thérapeutiques importantes.

V

Évaporé dans le vide, sur l'acide sulfurique, à la température de 25° environ, le liquide filtré laisse un résidu qui, en solution dans un peu d'eau, est très toxique, puisqu'il contient, sous un petit volume, la matière active d'une grande quantité de culture. L'alcool à 80° dissout une partie de l'extrait sec en se colo-

rant légèrement en jaune. Cet alcool, évaporé à basse température, donne un résidu brun alcalin, exhalant une odeur spéciale assez suave, et qui, abandonné à l'air, se prend presque tout entier en cristaux. L'extrait alcoolique, fourni par 90^{cc} de liquide filtré, a pu être injecté sous la peau d'un cobaye sans que celui-ci éprouve aucun mal ; l'alcool ne dissout donc pas le poison diphtérique : on le retrouve, en effet, tout entier dans la partie insoluble dans l'alcool. Celle-ci, dissoute dans un peu d'eau, donne une liqueur alcaline très active sur les cobayes et les lapins. Quand on y verse de l'alcool fort, on précipite de nouveau la matière active sous forme de flocons blancs grisâtres, absolument comme on précipite une diastase de sa solution aqueuse par addition d'alcool. Dans ces manipulations, il y a toujours un peu d'altération et de perte de la substance, et le pouvoir toxique du précipité paraît inférieur à celui du volume de liquide filtré qui l'a fourni.

Lorsqu'on calcine le résidu qui reste après l'épuisement par l'alcool, on obtient toujours une quantité assez notable de cendres. Pour en débarrasser autant que possible la matière toxique et l'avoir à un état de pureté plus grand, nous avons eu recours à la dialyse. L'extrait de 100^{cc} de liquide filtré évaporé dans le vide est épuisé par l'alcool à 80°, puis séché dans le vide pour enlever les vapeurs d'alcool. On le dissout ensuite dans 5^{cc} d'eau et on le verse sur un dyaliseur. Dans le vase extérieur de l'appareil à dyaliser on verse 12^{cc} d'eau que l'on renouvelle toutes les 24 heures¹. Au commencement de l'expérience, une seule goutte du liquide versé sur le papier-parchemin suffirait à faire mourir un cobaye. Le liquide extérieur, retiré au bout de 24 heures, est injecté sous la peau d'un lapin ; le lendemain on constate un fort œdème au point d'injection, et l'animal meurt le 4^e jour avec les lésions que cause le poison diphtérique. Celui-ci a donc passé en partie à travers le papier-parchemin. Toutes les 24 heures, on injecte ainsi à un lapin le liquide du vase extérieur ; le second lapin meurt plus vite que le premier, et le quatrième plus rapidement que le troisième. On arrête l'expérience au 4^e jour ; il reste 3^{cc} de liquide sur le dyaliseur, on

¹. L'appareil à dialyse a été préalablement stérilisé ; l'eau employée est stérilisée et, pour empêcher le développement de microbes, l'appareil est recouvert d'une cloche sous laquelle on met un petit vase contenant du chloroforme.

en injecte 2/8 de c. c. sous la peau d'un cobaye, qui meurt avec les lésions ordinaires le 4^e jour. L'activité toxique du liquide a donc diminué, ce qui doit être, puisque chaque jour il passait à travers la membrane dialysante une quantité de poison suffisante pour tuer un lapin. Le reste du liquide dialysé (2^{cc} et 3/4) est évaporé dans le vide; le résidu pèse 0^{gr},0015 et ne donne plus à la calcination qu'une quantité de cendres à peine appréciable.

Le poison diphtérique se dialyse donc lentement, ce qui explique que son action est d'abord locale, ainsi que l'indique la formation de l'œdème; il ne se répand que peu à peu dans le corps, aussi la même dose agit-elle plus rapidement quand on l'injecte dans le sang que quand on l'introduit sous la peau. On peut donner, par injection sous-cutanée, une quantité de substance active triple de la dose mortelle, sans que la mort survienne plus vite qu'avec une dose simple, parce que la diffusion dans le corps se fait beaucoup moins vite que celle d'une substance cristallisable.

VI

Le poison diphtérique, comme les diastases, a la propriété d'adhérer à certains précipités produits au sein du liquide où il est en dissolution. Le précipité qui entraîne le plus facilement la substance active de la diphtérie est le phosphate de chaux. A une culture filtrée, ajoutons goutte à goutte, et en agitant, une solution de chlorure de calcium, il se forme un précipité qui se rassemble au fond du vase. Si nous avons eu soin de verser une quantité de chlorure de calcium insuffisante pour que la précipitation soit complète, nous pourrons produire dans le liquide clair décanté un second précipité, et puis ensuite un troisième. Il est préférable de faire une précipitation fractionnée, parce que le premier précipité entraîne avec le poison diphtérique quelques-unes des matières contenues dans le bouillon de culture. Toutes ces manipulations doivent être faites avec pureté afin d'éviter l'introduction de microbes étrangers. Si on essaye le pouvoir toxique du liquide après chaque précipitation, on voit qu'il diminue de plus en plus. Au début de l'expérience, 1/5° de centimètre cube, injecté sous la peau d'un cobaye, le faisait périr; après la troisième précipitation, 2^{cc} sont inoffensifs. L'addition de chlorure de calcium a donc dépouillé le liquide d'une grande partie de la substance active, qui se trouve maintenant

rassemblée dans les précipités. Recueillons ceux-ci sur des filtres et lavons-les soigneusement à l'eau distillée stérilisée, puis introduisons sous la peau de cobayes et de lapins une parcelle de chacun des précipités humides, grosse comme un petit pois. Le lendemain les animaux ont un œdème qui grandit peu à peu, ils deviennent tristes et meurent le troisième ou le quatrième jour. En général, le second précipité est le plus actif, le troisième est encore très meurtrier. À l'autopsie on trouve toutes les lésions que cause le poison diptérique¹, mais dans ce cas elles sont plus intenses que celles qui suivent l'injection du liquide filtré ; l'œdème est plus hémorragique, les vaisseaux plus dilatés, il semble que le poison, diffusant plus lentement, produise une action locale plus intense. Les grains de phosphate de chaux sont emprisonnés dans un réseau de fibrine mêlé de globules blancs, véritable fausse membrane qui rappelle celle que cause l'injection du microbe lui-même.

En effet, le mode d'action du précipité n'est pas sans analogie avec celui du bacille. De même que le microbe élabore au point d'inoculation le poison qui se diffuse peu à peu, de même le précipité qui retient énergiquement la substance toxique ne la laisse passer que lentement dans les tissus. Au moment de la mort de l'animal, toute la matière active retenue par le phosphate n'est pas dispersée dans le corps ; il suffit, en effet, d'enlever avec soin le précipité avec un peu de l'œdème qui l'entoure, et de l'introduire sous la peau d'un second cobaye pour qu'il se développe chez lui l'œdème et les symptômes caractéristiques d'un empoisonnement diptérique.

Le précipité desséché dans le vide, et inséré sous la peau d'un cobaye ou d'un lapin, agit moins vite que le précipité humide, il est moins soluble dans les liquides acidulés et est sans doute plus difficilement attaqué dans les tissus ; il paraît retenir plus énergiquement la substance toxique, l'œdème s'étend plus lentement, mais la mort de l'animal n'en est pas moins sûre. Ce phosphate de chaux sec, chargé de poison diptérique, conserve plus longtemps ses propriétés actives que le liquide filtré et que le phosphate humide. Il peut être conservé longtemps à l'air, être chauffé à 70°, sans que sa

1. Les cobayes ont aussi de la pleurésie et les lapins de la dégénérescence du foie.

puissance toxique soit diminuée; chauffé à 100° au bain-marie pendant 20 minutes, il tue encore les cobayes. On a ainsi un moyen très commode pour conserver le poison diptérique. Calciné sur un lame de platine, ce précipité charbonne un peu et répand une odeur légère de corne brûlée; chauffé dans un tube clos, il dégage de l'ammoniaque; traité par l'alcool à 80°, il ne cède presque rien à ce véhicule. L'alcool évaporé ne donne en effet qu'un résidu inappréciable, qui dégage cependant l'odeur agréable dont nous avons parlé plus haut à propos de l'extrait alcoolique.

Le liquide au sein duquel on a fait les précipités de phosphate n'est pas devenu inerte; lorsqu'on en injecte des doses un peu fortes aux lapins ou aux cobayes, ils meurent en quelques jours, ou, s'ils résistent pendant quelque temps, ils ne tardent pas à maigrir et meurent après avoir présenté ces paralysies tardives signalées après les injections de liquides chauffés.

C'est le phosphate de chaux qui nous a paru entraîner le plus facilement le poison diptérique⁴. Le précipité gélatineux d'alumine, formé par addition de chlorure d'aluminium pur au liquide filtré, le fixe aussi, mais moins complètement, car après cette précipitation le liquide qui surnage est presque aussi toxique qu'avant. Le précipité alumineux soigneusement lavé est cependant capable de donner la mort aux animaux qui le reçoivent, même à faible dose. On peut agiter le liquide actif avec des quantités notables de noir animal sans qu'il perde de son énergie. Il serait très intéressant de trouver une matière insoluble capable de fixer le poison diptérique beaucoup plus fortement que le phosphate de chaux; on pourrait vraisemblablement l'introduire alors dans le corps des animaux sans produire d'accidents aigus : si la matière toxique adhérait assez au corps insoluble, elle ne diffuserait que lentement, et ainsi se produirait peut-être l'accoutumance graduelle de l'animal.

VII

Est-il possible de nous faire une idée plus précise de la puis-

4. Dans la filtration sur la porcelaine, une partie de la matière est retenue par la bougie poreuse. Il y en a peu d'arrêtée par les filtres durs, cuits à haute température; il y en a davantage avec les filtres tendres, cuits à température plus basse.

sance du poison diptérique, et de mesurer en poids la dose capable de tuer un cobaye ou un lapin? Ce que nous venons de dire de ce poison fait comprendre qu'il est très difficile de l'isoler à l'état de pureté et que, comme les diastases auxquelles il ressemble par tant de traits, il est toujours accompagné de substances étrangères. Nous allons cependant citer quelques chiffres qui montreront combien est grande son activité. Un centimètre cube de liquide actif évaporé dans le vide donne un centigramme de résidu sec. Si on défalque le poids des cendres et la portion insoluble dans l'alcool, qui n'a aucune action toxique, il reste un poids de quatre dixièmes de milligrammes de matière organique. Il est certain que la majeure partie de ces quatre dixièmes de milligramme sont formés de substances autres que le poison diptérique. Cette dose si faible est cependant suffisante pour faire périr au moins 8 cobayes de 400 grammes, ou deux lapins de 3 kilos chacun; un chien de 9 kilogrammes qui recevrait ces quatre dixièmes de milligramme dans le sang, s'il ne succombait pas, resterait très malade pendant longtemps.

Deux centigrammes du second précipité humide de phosphate de chaux, introduits sous la peau d'un cobaye, le font mourir en quatre jours. Ces deux centigrammes correspondent à un poids de matière organique inférieur à deux dixièmes de milligramme, et duquel il faudrait encore retrancher le poids des substances inertes que nous ne savons pas éliminer.

Le poison diptérique, qui est si actif quand il est introduit sous la peau, peut être ingéré en grande quantité par des cobayes et des pigeons sans que ces animaux paraissent en souffrir. Dix centimètres cubes du liquide filtré ont été ingérés par un pigeon sans qu'il témoigne aucun malaise les jours suivants, et cependant $\frac{2}{5}$ de centimètre cube du même liquide, injectés sous la peau d'un second pigeon, le faisaient mourir en 60 heures. L'introduction de $\frac{1}{2}$ centimètre cube du même liquide dans la trachée des pigeons les tue après 4 ou 5 jours, sans que d'ailleurs on constate aucune lésion des organes respiratoires.

De tout ce qui précède, il nous paraît ressortir que le poison diptérique a beaucoup d'analogies avec les diastases, son activité est tout à fait comparable à celle de ces substances ou encore à celle des venins. Nous n'entendons pas dire cependant qu'il produit des phénomènes d'hydratation semblables à ceux que

causent les diastases; il n'intervient point le sucre, ne digère point la fibrine. Si nous le comparons aux diastases, c'est sans préjuger son action chimique, et seulement pour rappeler quelques-unes de ses propriétés. Dans le corps des animaux, le poison de la diphtérie nous paraît agir surtout sur les parois des vaisseaux; les dilatations vasculaires, les hémorragies, les œdèmes que l'on trouve à l'autopsie des animaux diphtériques sont à l'appui de cette opinion.

La grande activité du poison diphtérique peut amener à regarder comme très virulentes des cultures de diphtérie qui ne le sont pas. Si l'on injecte par exemple sous la peau d'un cobaye une quantité très faible ($1/8$ de c.c.) d'une culture ancienne, l'animal succombera, et l'on pourra attribuer sa mort à la virulence des bacilles injectés, tandis qu'en réalité ils sont incapables de pulluler sous la peau des animaux. Ils ne faut donc pas confondre l'action toxique des cultures avec leur virulence. La virulence est l'aptitude d'un microbe à se développer dans le corps d'un animal vivant; cette aptitude est en général augmentée par le passage au travers d'une série d'animaux. La propriété de faire des poisons dans les cultures peut appartenir à des microbes inoffensifs dépourvus de toute virulence.

Il est difficile d'habituer les animaux au poison diphtérique, précisément à cause de son activité. Même à doses très faibles, il produit souvent des effets à longue échéance. C'est à cause de ce pouvoir toxique énergique qu'il faut intervenir dès le début de la formation des fausses membranes chez les diphtériques. Si on a laissé au bacille le temps de former une dose suffisante de poison, c'est en vain que l'on fera disparaître la membrane croupale et qu'on détruira les bacilles, la mort surviendra par empoisonnement; car dans la diphtérie, contrairement à ce qui se passe pour beaucoup d'autres maladies infectieuses, l'infection n'est pas produite par un microbe envahissant les tissus, mais par la diffusion dans l'organisme d'une substance toxique préparée à la surface d'une muqueuse, pour ainsi dire en dehors du corps.



ÉTUDES SUR L'IMMUNITÉ

PAR M. EL. METCHNIKOFF.

I. Immunité des lapins contre le bacille du rouget des porcs.

L'immunité contre les agents infectieux doit être considérée comme un phénomène compliqué, dépendant à la fois de causes physiques, chimiques et biologiques. Dans quelques cas elle est produite par l'association de ces différents facteurs ; dans d'autres elle ne dépend que de l'un d'eux. Ainsi il est très probable que l'immunité de beaucoup d'animaux à sang froid contre la tuberculose tient uniquement à leur température trop basse pour permettre le développement des bacilles tuberculeux. Comme exemple d'immunité due à une cause purement chimique, je citerais le cas des rats blancs, dont l'état réfractaire contre le charbon est attribué par M. Behring¹ uniquement au degré d'alcalinité de leur sang, si l'exactitude de l'interprétation de M. Behring ne soulevait pas quelques doutes justifiés. Enfin, parmi les causes biologiques, je mentionnerai l'action cellulaire en général, et notamment le rôle microbicide des phagocytes, qui a été accepté par plusieurs observateurs, et que j'ai tâché de démontrer dans plusieurs cas d'immunité naturelle ou acquise.

Le point le plus difficile dans cette étude est de séparer les différents agents qui peuvent concourir à produire l'immunité. MM. Hess², Ribbert³, Petruschky⁴ et moi-même nous avons tâché d'éliminer l'action phagocytaire, soit en introduisant les microbes dans la chambre antérieure de l'œil, soit en les isolant pour un certain temps entre des plaques de verre, soit surtout en enfer-

1. *Centralblatt f. klinische Medicin*, 1888, n° 38, p. 681. Voir ces *Annales* 1889, t. I, p. 39.

2. *Archives de Virchow*, 1887, t. CIX, p. 365.

3. *Der Untergang pathogener Schimmelpilze im Körper*, Bonn 1887, p. 52.

4. *Untersuchungen über die Immunität des Frosches gegen Milzbrand*. Iena, 1888.

mant les microbes dans des membranes perméables aux corps en solution, et introduites dans l'organisme réfractaire¹. Bien que ces méthodes aient déjà donné des résultats, il serait bien désirable de trouver d'autres moyens pour isoler les diverses influences jouant un rôle dans la production de l'immunité.

MM. Emmerich et di Mattei², en étudiant l'immunité des lapins contre les bacilles du rouget des porcs, se sont trouvés en présence de faits qui leur ont paru supprimer toute influence intracellulaire et les ont conduits à nier le rôle phagocytaire des cellules dans la production de l'immunité dans ce cas. Ils ont vu que les bacilles du rouget, injectés dans l'organisme des lapins réfractaires, étaient complètement détruits déjà de 15 à 25 minutes après leur introduction, même si la quantité de culture injectée était très considérable. Ce laps de temps si court met hors de cause l'intervention des phagocytes, qui doivent d'abord s'accumuler autour de la culture injectée, ensuite englober les bacilles et enfin les détruire ; aussi MM. Emmerich et di Mattei attribuent exclusivement la destruction des bacilles du rouget à un liquide antiseptique très actif, accumulé dans les lapins réfractaires. Dans sa communication au Congrès hygiénique de Vienne, M. Emmerich a exprimé l'opinion que ce liquide bactéricide était une sécrétion des bacilles mêmes : produit lors de l'inoculation préventive avec les bacilles du rouget, ce liquide persisterait dans l'organisme des lapins devenus réfractaires, et empêcherait le développement ultérieur des mêmes microbes. Mais dans leur travail complet, MM. Emmerich et di Mattei révoquent cette théorie en la remplaçant par une autre : le liquide antiseptique est pour eux le produit non des bacilles, mais des cellules de l'organisme réfractaire, qui, toutes également, aussitôt après avoir subi l'impression de la part des microbes, sécrètent la substance soluble chargée de les détruire.

Ces savants concluent donc que « les phagocytes n'ont absolument rien à faire avec le mécanisme de l'immunité, qui fonctionne sans leur concours » (*l. c.*, p. 737). A l'appui de cette assertion, MM. Emmerich et di Mattei invoquent le fait que pen-

1. *Archives de Virchow*, 1888, t. CIV, p. 463.

2. Travaux des sections d'hygiène du Congrès de Vienne, 1888. Suppléments des cahiers I-XVIII, XX, XXI, XXIII, p. 152 et *Fortschritte der Medicin*, 1888, t. VI, p. 720.

dant tout le cours de leurs recherches ils n'ont jamais observé ni accumulation des phagocytes, ni englobement des bacilles du rouget par ces cellules. Par contre ils ont constaté que 23 minutes après l'injection de 8^{cc} d'une culture du rouget dans du bouillon, les bacilles se trouvaient libres dans le tissu sous-cutané; mais, après avoir été colorés par la méthode de *Gram*, ils présentaient déjà des signes évidents de destruction.

Il n'est point étonnant qu'une théorie dans laquelle « l'organisme immunisé agit comme une solution de bichlorure de mercure ou de quelque autre substance bactéricide des plus fortes » (*l. c.*, p. 738) ait attiré l'attention générale du monde scientifique. Aussi M. *Buchner*¹, dans son récent article sur l'immunité, cite les faits énoncés par MM. Emmerich et Mattei comme une preuve réelle des influences *chimiques* dans l'organisme, influences complètement indépendantes de toute action phagocytaire. M. *Buchner* semble ne pas remarquer que ces faits portent une atteinte grave à tout l'ensemble de la théorie des phagocytes, à laquelle il est loin d'être opposé. Il se peut bien d'ailleurs que dans tel ou tel cas d'infection, l'immunité soit produite, tout à fait en dehors des phagocytes, par un procédé quelconque, mais il ne faut pas citer le rouget des porcs comme exemple à l'appui : nous allons voir en effet que les bacilles de cette maladie sont généralement englobés par les phagocytes.

Tel est au moins la conclusion de mes études sur la disparition des bacilles du rouget dans l'organisme des lapins réfractaires. Je me suis mis à l'œuvre immédiatement après l'apparition de la première note de M. Emmerich. Mais aussitôt se produisit un obstacle sérieux qui entraîna pour un certain temps la marche de mes recherches. Le procédé indiqué par M. Emmerich pour obtenir l'immunité des lapins m'a donné des résultats tout à fait opposés aux siens. L'injection intraveineuse de 1^{cc} de culture du bacille du rouget, au lieu de vacciner les lapins, donnait au contraire une maladie mortelle aux chétifs lapins d'Odessa aussi bien qu'aux robustes lapins français. L'assertion de MM. Emmerich et di Mattei, que « les animaux ainsi inoculés réagissent d'une manière beaucoup plus vigoureuse que contre les inocu-

1. *Immunität und Immunisirung, Münchener medicinische Wochenschrift*, 1889, nos 2 et 3.

lations sous-cutanées des bacilles du rouget » (*l. c.*, p. 730) est donc inexacte. Les recherches suivies du laboratoire de M. Pasteur ont prouvé que l'introduction des bacilles du rouget dans les veines du lapin donnait beaucoup plus sûrement la maladie que leur injection sous la peau, fait dont j'ai pu me persuader à maintes reprises. Du reste, les protocoles des expériences de MM. Emmerich et di Mattei¹ prouvent que leurs lapins résistaient aux inoculations sous-cutanées aussi bien qu'aux injections intraveineuses. On peut en conclure que leur virus était déjà affaibli, et que leurs lapins s'y montraient dès le début réfractaires. A l'appui de cette conclusion je citerai encore le fait suivant. Dans un travail fait dans le laboratoire de M. Emmerich, M. Kourloff² dit que les lapins avec lesquels il opérait à Munich étaient réfractaires même à des doses de 15^{cc} de culture des bacilles du rouget. Il s'agissait donc dans toutes ces expériences, non d'une immunité obtenue artificiellement, comme le pensent MM. Emmerich et di Mattei, mais bien d'une immunité naturelle contre un virus affaibli, différence qui ne doit être nullement négligée.

Pour obtenir une immunité sûre des lapins contre le virus fort des bacilles du rouget, je soumettais mes animaux aux inoculations préventives avec les deux vaccins de MM. Pasteur et Thuillier, que j'injectais tantôt sous la peau et tantôt dans les veines des oreilles. Les inoculations deux fois répétées avec le premier vaccin étaient suivies de deux injections du second vaccin. Après la dernière, je faisais encore une injection d'épreuve avec le virus virulent, avant d'entreprendre les expériences définitives.

Comme MM. Emmerich et Mattei disent (p. 745), que la destruction des bacilles du rouget, dans le lapin réfractaire,

1. Dans plusieurs de leurs expériences, MM. Emmerich et di Mattei commençaient par inoculer les bacilles sous la peau, ce qui n'amenait nullement la mort des lapins; dans leur sixième expérience, le lapin a supporté parfaitement une injection sous-cutanée de 3^{cc} d'une culture dans du bouillon (*l. c.*, p. 733).

2. Dans le journal russe *Wratch*, 1888, n° 47, p. 938. Dans ce même travail M. Kourloff rapporte le résultat de ses expériences qui sont en complet désaccord avec les assertions de MM. Emmerich et di Mattei. Tandis que ces auteurs affirment (*l. c.*, p. 734) que les bacilles injectés dans les veines des lapins réfractaires périssent totalement au bout d'une heure, M. Kourloff cite quatre expériences dans lesquelles il a obtenu des cultures avec les organes de lapins réfractaires autopsiés 2 et même 5 heures après l'injection des bacilles dans les veines de l'oreille.

s'opère tout à fait de la même façon, quelle que soit la dose injectée, je n'inoculais dans mes expériences que quelques gouttes de culture des bacilles dans du bouillon; quelquefois je portais la dose à 1^{cc} et très rarement à 2^{cc}. Jamais je n'appliquais les doses énormes employées par les auteurs cités. Ce sont évidemment des conditions favorables à leur thèse, défavorables à la mienne.

Après un temps qui n'a été qu'une fois d'une heure et demie, et qui était le plus souvent de 4, 6, 12, 19, 24 heures et au delà, jusqu'à 6 jours, après l'introduction du virus sous différentes régions de la peau des lapins réfractaires (celle des oreilles, des jambes, du dos et de la tête), je faisais une petite piqûre dans l'endroit inoculé, et j'enlevais à l'aide d'un tube effilé une ou quelques gouttes de liquide. Ce dernier était quelquefois tout à fait transparent, mais le plus souvent il était coloré en rose par le sang, et dans plusieurs cas il n'était composé que de sang presque pur.

Le liquide ainsi obtenu était ensemencé dans du bouillon de veau à 1/2, avec 1 0/0 de peptone, ce qui constitue le meilleur milieu pour la croissance des bacilles du rouget des porcs. Quelquefois, je faisais en outre des cultures dans la gélatine et des préparations étalées sur des lamelles.

Sur 15 expériences ainsi faites, 4 ont abouti à un résultat négatif, en ce sens que le liquide, pris dans l'endroit inoculé 6 heures 45 minutes, 17, 19 et 26 heures après l'inoculation, n'a point donné de culture du bacille dans le bouillon. Dans 11 autres expériences, où le liquide a été puisé 1 heure 1/2, 4, 5, 6, 6 heures 40 minutes, 19, 20, 24 heures et 4 jours après l'introduction du virus, le bouillon ensemencé a donné des cultures pures des bacilles du rouget des porcs (Voir Appendice, tab. I). Plusieurs de ces cultures ont été inoculées à des souris et des pigeons, et se sont toujours montrées d'une virulence normale.

Le résultat est, en somme, diamétralement opposé à celui de MM. Emmerich et di Mattei, et j'ai dû rechercher les causes de la contradiction. Comme il résulte des données fournies par ces savants eux-mêmes que l'immunité de leurs lapins n'était nullement acquise à l'aide d'inoculations préventives, mais que c'était bien une immunité naturelle contre un virus affaibli, j'ai entrepris plusieurs séries d'expériences dans cette même voie.

J'ai inoculé d'abord à deux lapins, qui, après des injections sous-cutanées du virus virulent, s'étaient montrés réfractaires, 4^{ce} du même virus, que j'ai introduit sous la peau des oreilles et du dos. Le liquide, retiré 2 et 6 heures après, a donné des cultures pures des bacilles du rouget. Dans 3 autres expériences avec les mêmes lapins, j'ai obtenu un résultat négatif, en extrayant le liquide 5, 6 et 24 heures après l'inoculation. Comme dans cette série le virus employé était plus fort que celui de MM. Emmerich et di Mattei, j'ai entrepris encore quelques expériences avec les bâcilles atténus, mais au lieu de me servir d'un virus affaibli quelconque, j'ai adopté les deux vaccins de MM. Pasteur et Thuillier. Quatre inoculations de quelques gouttes du premier vaccin, faites sous la peau de l'oreille d'un lapin frais et de deux autres qui avaient reçu auparavant le premier et même le second vaccin, ont toutes donné un résultat positif : le liquide, recueilli 4, 19, 20 et 24 heures après l'injection, a produit des bacilles du premier vaccin. Dans 2 expériences avec le second vaccin, inoculé à des lapins qui avaient préalablement reçu les deux vaccins et plusieurs fois le virus virulent, le liquide, pris 19 heures après l'injection, a donné une culture, tandis qu'un autre, recueilli 26 heures après le début de l'expérience, s'est montré stérile (Voir Appendice, n° 3).

Le résultat général des trois séries est donc que sur 28 expériences, 20 fois les bacilles injectés sous la peau des lapins réfractaires se sont maintenus vivants pendant une période de 1 heure 1/2 à 4 jours. On voit bien qu'il ne s'agit pas ici d'une destruction rapide comme dans les expériences de MM. Emmerich et di Mattei, et que l'immunité des lapins contre les bacilles du rouget ne fait pas exception à la règle générale établie pour la destruction d'autres bactéries dans l'organisme des animaux réfractaires.

Voilà donc disparu l'argument qui nous avait conduits à éliminer toute influence phagocytaire dans le mécanisme de la production de l'immunité. Il est clair que les phagocytes ont le temps d'agir, mais nous n'avons pas encore démontré qu'ils agissent. Il fallait donc chercher un moyen pour élucider cette question.

Comme milieu naturel plus ou moins exempt de phagocytes, j'ai choisi la chambre antérieure de l'œil. Si la destruction des

bacilles introduits s'opère à l'aide de liquides, laissés par les microbes eux-mêmes ou sécrétés par les cellules de l'organisme réfractaire, on ne voit pas pourquoi ces substances n'agiraient pas dans la chambre antérieure aussi bien que dans un espace lymphatique quelconque. J'ai fait, sur ce point, dès 1887, une série d'expériences, dont un résultat a été inséré dans mon article sur la *Pasteuria ramosa*¹. J'ai pu constater que les bacilles du premier vaccin du rouget se conservaient longtemps dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, ainsi que les bacilles du rouget virulent dans l'œil de chiens, animaux naturellement réfractaires. MM. Emmerich et di Mattei ont depuis confirmé ce résultat, en ce sens qu'ils ont observé (en collaboration avec M. Pinto) que les bacilles de leur rouget virulent se conservaient, dans la chambre antérieure de l'œil des lapins réfractaires, pendant 24 heures et plus longtemps (*l. c.*, p. 743). Comme ces savants n'ont pu constater dans leurs expériences aucune accumulation de phagocytes dans l'œil, ni trouver des bacilles dans l'intérieur de ces cellules, ils cherchent à expliquer la longévité des microbes du rouget dans la chambre antérieure de l'œil par la trop petite quantité de liquide bactéricide sécrété par les cellules de l'iris. Mais si cette dose n'est pas suffisante au début de l'affection, elle devrait l'être encore moins par la suite, de sorte qu'on ne s'explique pas bien, d'après la théorie de MM. Emmerich et di Mattei, pourquoi les bacilles finissent par périr dans l'humeur aqueuse même².

Dans quelques-unes de mes expériences, j'injectais une goutte du premier vaccin dans la chambre antérieure de l'œil de lapins qui avaient déjà subi plusieurs injections préalables du virus virulent sous la peau. Ainsi un lapin a reçu sept fois de ce virus ayant d'être inoculé par le premier vaccin dans l'œil, ce qui n'a nullement empêché, ainsi que chez les autres lapins, l'accumulation très prononcée des leucocytes dans la chambre antérieure. Une goutte d'humeur aqueuse, retirée 22 heures après l'injection dans l'œil, a donné une culture pure des

1. Voir ces *Annales*, 1888, no 4.

2. Pour le lecteur qui n'aurait pas sous la main le mémoire de MM. Emmerich et di Mattei, je dois ajouter que, d'après leur théorie, le liquide sécrété par les cellules, s'écoulant avec l'humeur aqueuse de la chambre antérieure, et se résor-
bant partiellement par l'iris même, se trouvait très affaibli.

bacilles du premier vaccin, tandis qu'une autre, retirée 48 heures après le début de l'expérience, a laissé le bouillon ensemencé dans un état de pureté et de limpidité parfaite (Voir l'Appendice, n° 4).

On voit donc d'abord que le premier vaccin occasionne des troubles marqués dans la chambre antérieure de l'œil des animaux tout à fait réfractaires, et ensuite que les bacilles périssent dans l'espace de 24 à 48 heures après l'inoculation.

En recherchant la cause de cette destruction, j'ai été plus heureux que MM. Emmerich et Pinto, parce que j'ai pu me convaincre facilement que les bacilles du vaccin étaient englobés par les leucocytes immigrés dans la chambre antérieure. Sur chaque préparation du liquide retiré le lendemain de l'opération, et coloré d'après la méthode de Gram, il se trouvait un nombre considérable de leucocytes, dont beaucoup contenaient une quantité variable de bacilles (Pl. V, fig. 13, 14). Quelquefois les cellules en étaient tellement remplies qu'on pouvait à peine distinguer leur noyau. Tandis qu'un grand nombre des bacilles englobés se coloraient comme d'habitude, quelques-uns d'entre eux conservaient mal la coloration primitive (fig. 15), ce qui indiquait leur état dégénéré.

Il n'était donc pas difficile de constater le rôle des phagocytes dans l'affection produite par le premier vaccin du rouget, introduit dans la chambre antérieure. La persistance des bacilles dans l'humeur aqueuse s'explique par l'absence des phagocytes, leur destruction par l'intervention des leucocytes.

La recherche des phénomènes cellulaires consécutifs à l'injection des bacilles du rouget sous la peau présentait beaucoup plus de difficultés. Le liquide, retiré en petite quantité de l'endroit inoculé, fixé sur des lamelles et coloré par différentes méthodes, ne présentait presque jamais de bacilles libres ou englobés par des cellules. Mais ce résultat négatif ne pouvait rien prouver, parce qu'il ne donnait aucune réponse à la question de savoir ce qu'étaient devenus les bacilles introduits. Il fallait donc recourir à un autre moyen ; c'est ce que j'ai fait en appliquant la méthode employée par M. Hess dans ses recherches sur la phagocytose. Mais au lieu de me servir des petites chambres de M. Ziegler, j'introduisais sous la peau de la cuisse des lapins un système

composé de quatre lamelles réunies avec de la cire à cacheter¹, et tout à fait trempé dans une culture de bacilles du rouget virulent. Après un séjour de 1 à 50 heures sous la peau, les lamelles étaient retirées, isolées les unes des autres et colorées avec le bleu de méthylène, ou, le plus souvent, d'après la méthode de Gram.

La pénétration des leucocytes entre les lamelles ainsi introduites sous la peau des lapins réfractaires pouvait être constatée déjà une heure après le début de l'expérience. A côté des grandes masses de bacilles parfaitement colorés se trouvaient un nombre restreint de microphages immigrés, dont quelques-uns contenait déjà des bacilles qui se coloraient aussi bien que les autres (fig. 4); sur des lamelles retirées 2 heures 1/2 après leur introduction sous la peau d'un lapin qui avait déjà résisté à six injections antérieures du virus, la quantité de leucocytes était très considérable, ainsi que le nombre de bacilles englobés. Dans quelques phagocytes, je pouvais compter de 20 à 28 bacilles, ce qui seul suffit déjà pour démontrer l'inexactitude de l'asser-tion de MM. Emmerich et di Mattei, « qu'un phagocyte emploie un quart d'heure pour englober un seul bacille » (*l. c.*, p. 736). D'après ce calcul, un leucocyte ne pouvait contenir, 2 heures 1/2 après l'introduction de la culture, que dix bacilles, tandis qu'en réalité il en contenait plus du double. Il est évident qu'un phagocyte peut en même temps englober tout un amas de bacilles au lieu de les avaler un à un, et encore faut-il remarquer que ce délai d'un quart d'heure, fixé par MM. Emmerich et di Mattei, n'est appuyé par aucune preuve réelle.

Les bacilles intracellulaires, dans le cas que je viens de décrire, avaient pour la plupart une coloration ainsi qu'un aspect tout à fait normal (fig. 2, 5), et il n'y avait qu'un très petit nombre de bacilles montrant des signes de dégradation (fig. 3, 6). D'autres bacilles paraissaient présenter la couleur supplémentaire de la vésuvine (fig. 2), mais un examen soigneux démontrait qu'il s'agissait ici de bacilles logés dans la profondeur des leucocytes.

Dans toutes mes expériences avec les lamelles introduites sous la peau, le résultat a toujours été le même, à savoir que les

1. Pour faciliter l'accès des liquides de l'organisme, je laissais entre les lamelles réunies un espace beaucoup plus grand que dans les chambres de MM. Ziegler et Hess, où il était capillaire.

bacilles injectés étaient, dans une période assez courte, englobés par les leucocytes immigrés, dont le nombre augmentait en raison du temps écoulé.

L'expérience de contrôle, faite avec un lapin non réfractaire, sous la peau duquel j'introduisais les lamelles tout à fait comme chez d'autres, m'a montré que les leucocytes englobaient également un nombre assez considérable de bacilles, ce qui concorde parfaitement avec les faits établis par plusieurs observateurs (*Schütz, Schottelius, Pampoukis*), que les globules blancs sont le siège favori des bacilles chez les animaux sensibles au rouget des porcs (porcs, pigeons, lapins, etc.).

La différence entre les phénomènes phagocytaires chez les lapins réfractaires et chez les animaux sensibles à la maladie ne se manifestait d'une manière plus ou moins nette qu'après un plus long séjour des bacilles sous la peau. Ainsi, sur les lamelles retirées 50 heures après leur introduction sous la peau d'un lapin réfractaire, la presque totalité des bacilles présentaient des signes indubiables de dégradation (fig. 6, 12) : leurs contours avaient perdu leur netteté habituelle, la coloration primitive ne se conservait qu'imparfaitement, et le contenu des bacilles était devenu granuleux. Plusieurs bacilles, n'étant plus capables de retenir la couleur violette, présentaient la teinte supplémentaire de la vésuve. Une petite quantité de microbes conservaient cependant leurs propriétés normales, ce qui concorde parfaitement avec le fait que du bouillon,ensemencé avec le liquide retiré des lamelles, donne des cultures pures du bacille du rouget.

On voit donc que dans notre cas la destruction des bacilles, qui n'était pas complète encore 50 heures après l'introduction des lamelles, s'était opérée dans l'intérieur des leucocytes. Je dois ajouter ici qu'un certain nombre de bacilles plus ou moins dégradés se trouvaient aussi, sur des préparations étalées, en dehors des cellules. Mais, comme je l'ai indiqué dans mon travail sur les bactéridies¹, la méthode des préparations desséchées amène inévitablement la rupture de beaucoup de leucocytes, dont une certaine quantité peuvent être aussi détruits par les bacilles englobés à l'état vivant.

1. *Archives de Virchow*, t. CXIV, p. 480-482.

Chez les animaux sensibles au rouget des porcs, et entre autres chez les lapins non réfractaires, le plus grand nombre des bacilles se trouve également englobé dans des phagocytes, mais présente un état tout à fait normal et se colore parfaitement. Ainsi M. Schütz¹, en relatant l'autopsie d'un lapin mort du rouget, mentionne la présence des bacilles dans l'intérieur de cellules rondes (*Rundzellen*) et ajoute que « plusieurs de ces cellules étaient remplies par de telles masses de bacilles qu'à de faibles grossissements elles se présentaient comme des taches fortement colorées ». Pendant mes recherches sur le rouget des animaux sensibles à cette maladie, je n'ai observé que très rarement les bacilles intracellulaires à l'état de dégénérescence. Ainsi j'ai vu, dans un leucocyte mononucléaire (macrophage) du sang d'un pigeon mort du rouget, à côté d'une grande quantité de bacilles fortement colorés, une vacuole (fig. 16, v.) renfermant plusieurs bacilles à peine colorés par le bleu de méthylène, et par suite présentant des signes évidents de dégénérescence.

Dans son mémoire cité sur l'immunité (*l. c.*, p. 18 du tirage à part), M. Buchner rapporte ce fait, que dans les expériences de M. Voit, les bacilles du rouget périsseent même dans le sang des animaux non réfractaires. Ce cas serait donc analogue aux résultats de M. Nuttall; mais, comme les deux séries d'observations ne se rapportent qu'au sang retiré de l'organisme, elles ne sont pas en état d'expliquer l'immunité. Du reste, MM. Emmerich et di Mattei ont démontré que le sang même des lapins réfractaires donnait des cultures du bacille du rouget. M. E. Roux m'a communiqué que, d'après ses expériences, le sang des lapins est un milieu spécialement favorable à ces bactéries. Je puis ajouter qu'elles végètent bien aussi dans le sang et dans l'urine des lapins tout à fait réfractaires, quand on les ensemence dans ces liquides recueillis peu de temps après que l'animal a supporté des doses considérables des cultures du bacille du rouget.

En résumant tous les faits énoncés dans cet article, je puis conclure d'abord que la présence dans l'organisme réfractaire d'un liquide antiseptique, annoncée par MM. Emmerich et di Mattei, ne s'est point confirmée par mes recherches. La destruction exceptionnellement rapide des bacilles, admise par ces

1. *Arbeiten aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, t. I, 1885, p. 61.

auteurs, ne s'est également pas confirmée. D'un autre côté les phagocytes, dont le rôle a été complètement nié par ces deux savants, se sont présentés à moi comme de véritables agents de destruction des bacilles dans l'organisme des lapins réfractaires. Ce fait suffirait à lui seul pour attribuer une importance à ces cellules dans le mécanisme de l'immunité. De plus, si nous considérons que les expériences dans la chambre antérieure de l'œil et les lamelles introduites sous la peau démontrent le rôle prépondérant des cellules migratrices¹, l'importance des phagocytes ressortira avec une évidence plus grande encore.

On a souvent objecté contre la théorie des phagocytes que ces cellules n'étaient capables d'englober que les microbes préalablement tués ou du moins très affaiblis par l'influence extra-cellulaire des liquides. Dans le cas du rouget des porcs, cette objection ne doit pas être soulevée, parce qu'il est bien établi, même pour les animaux sensibles, que des bacilles très virulents se trouvent ordinairement dans l'intérieur des phagocytes. Seule-

1. M. Wysokowitch, dans plusieurs de ses articles et entre autres dans celui qui est publié dans ce numéro des *Annales*, cherche à prouver, d'abord que les leucocytes ne sont pour rien dans la destruction des microbes et ne jouent par conséquent aucun rôle dans l'immunité, et que ce sont les cellules fixes du tissu conjonctif qui accomplissent ces fonctions. Ensuite il prétend que c'est lui qui le premier a attiré l'attention sur le rôle phagocytaire des cellules fixes, et qu'en proposant mes *macrophages*, après la publication du premier article de M. Wysokowitch, je n'ai fait autre chose que d'accepter sa théorie. Je me crois obligé de lui répondre en quelques mots. 1^o Avant d'être démontré dans cet article, le rôle des leucocytes dans la destruction des microbes et dans le mécanisme de l'immunité a été à maintes reprises constaté par moi-même et par plusieurs autres observateurs (*Ribbert, Hess, Lubarsch, Banti, Karg, etc.*).

2^o Dans mes articles publiés en 1883 dans le recueil de M. Claus et dans le *Biologisches Centralblatt*, et en 1884 dans les *Archives de Virchow*, c'est-à-dire trois et deux ans avant la première publication de M. Wysokowitch (printemps 1886), j'insistais déjà sur le rôle phagocytaire des cellules du tissu conjonctif, et j'ai fait la description des grandes cellules phagocytes qui plus tard ont été désignées comme *macrophages*.

3^o Ce terme a été créé pour désigner un grand nombre de phagocytes (cellules de la pulpe splénique, endothéliales, du tissu conjonctif et de l'épithélium pulmonaire). Dans mon travail sur la tuberculose (*Archives de Virchow*, juillet 1888), j'ai surtout insisté sur le fait qu'un grand nombre de leucocytes du sang sont également des macrophages, de sorte que « leucocyte et macrophage » ne sont nullement des termes opposés.

4^o Si, pendant le cours de mes recherches, je devais modifier mon opinion sur le rôle phagocytaire des différentes cellules, ce serait justement en ce sens que les cellules fixes du tissu conjonctif ne seraient que très rarement phagocytes, tandis que les leucocytes (microphages et macrophages) le sont dans un degré tout à fait prédominant.

ment, chez ces animaux, les bacilles englobés restent pour la plupart intacts, ou détruisent même les cellules englobantes, tandis que chez les lapins réfractaires c'est l'inverse qui a lieu.

Nous avons donc dans le rouget des porcs un exemple d'immunité qui non seulement ne sert pas d'objection contre la théorie des phagocytes, mais qui fournit encore une nouvelle preuve en sa faveur, d'autant plus que dans la tuberculose, affection accompagnée également d'un englobement de bacilles, notamment intacts, par les phagocytes, on ne connaît pas encore d'immunité acquise à l'aide d'inoculations préventives.

EXPLICATION DES FIGURES.

Toutes les figures ont été faites à l'aide d'une chambre claire de Nachet et à un grossissement obtenu avec l'oculaire 4 et le système à immersion homogène 1/18 de Zeiss.

Fig. 1. — Trois bacilles libres et six englobés par un leucocyte polynucléaire, *a*, un bacille vu en coupe optique transversale. Coloration : Aniline-gentiane et vésuvine. Préparation étalée d'un lapin réfractaire faite une heure après l'introduction du système de lamelles sous la peau.

Fig. 2. — Un leucocyte polynucléaire contenant à peu près 28 bacilles et pris sur une lamelle retirée deux heures après son introduction sous la peau d'un autre lapin réfractaire. Les bacilles colorés en brun se trouvent dans la profondeur de la cellule.

Fig. 3. — Un autre leucocyte polynucléaire de la même préparation, contenant à peu près 20 bacilles, dont un, *b*, présente des signes de destruction.

Fig. 4 et fig. 5. — Deux autres microphages du même lapin avec des bacilles englobés, 2 heures 1/2 après le début de l'expérience.

Fig. 6, 7, 8, 9, 10, 11. — Microphages remplis de bacilles plus ou moins dégénérés du même lapin, sur des préparations faites 30 heures après l'introduction des lamelles sous la peau.

Fig. 12. — Un macrophage de la même expérience.

Fig. 13 et 14. — Leucocytes polynucléaires de la chambre antérieure de l'œil d'un lapin réfractaire, 19 heures après l'injection du premier vaccin.

Fig. 15. — Un autre microphage du même cas avec des bacilles faiblement colorés. La coloration des cellules des figures 2 à 15 est la même que celle de la figure 1.

Fig. 16. — Un leucocyte du sang d'un pigeon mort du rouget. — *v*, vacuole, renfermant des bacilles pâles.

APPENDICE

I. — *Injection de virus sous la peau de lapins réfractaires par vaccination.*

Numéro de l'expérience.	Indication des lapins.	Point d'inoculation.	Temps après lequel on a retiré le liquide.	Résultat de l'ensemencement du liquide.
1	A	Oreille.	4 heures.	+
»	»	Id.	48 heures.	+
»	»	Id.	4 jours.	+
»	»	Id.	6 jours.	-
2	B	Oreille.	20 heures.	-
»	»	Id.	70 heures.	-
3	»	Dos.	4 heures.	+
4	,	Id.	26 heures.	-
5	»	Id.	1 h. 30 m.	+
6	»	Tête.	17 heures.	-
7	»	Jambo.	49 heures.	-
8	C	Jambe.	5 heures.	+
9	»	Oreille.	24 heures.	+
10	»	Dos.	4 heures.	+
11	»	Oreille.	19 heures.	+
12	»	Jambe.	6 heures.	+
13	D	Oreille.	6 h. 40 m.	+
14	E	Oreille.	6 h. 45 m.	-
15	»	Oreille.	5 heures.	+

II. — *Injection du virus sous la peau de lapins naturellement réfractaires.*

16	F	Oreille.	24 heures.	-
17	"	Jambe.	5 heures.	-
18	"	Oreille.	6 heures.	+
19	"	Jambe.	6 heures.	-
20	"	Oreille.	6 heures.	+
21	"	Dos.	2 heures.	+

III. — *Injection sous la peau du premier vaccin du rouget.*

22	Lapin frais	Oreille.	20 heures.	+
23	A, après des doses de 1 ^{er} et 2 ^{me} vaccin.	Id.	4 heures.	+
24	Id.	Id.	49 heures.	+
25	B, après une dose de 2 ^{me} vaccin.	Id.	24 heures.	+
26	B, après 2 doses du 1 ^{er} vaccin, 2 du 2 ^{me} , et 4 du virus.	Id.	49 heures.	+
27	C, après 3 doses du 1 ^{er} vaccin, 1 du 2 ^{me} , et 5 du virus.	Dos.	26 heures.	-

IV. — *Injection dans la chambre antérieure de l'œil.*

N° de l'expé- rience.	Indication des animaux.	Qualité de la culture injectée.	Temps après lequel le liquide a été retiré de l'œil.	Résultat de l'en- semencement de ce liquide.
28	Chien.	Virus virulent.	4 heures.	+
29	Chien.	Virus virulent.	23 heures.	+
30	Chien.	Virus virulent.	32 heures.	+
31	Lapin H	1 ^{er} vaccin.	20 heures.	+
32	» J	1 ^{er} vaccin..	43 heures.	+
33	» K	1 ^{er} vaccin.	55 heures.	+
34	Lapin E après 2 doses du 1 ^{er} vaccin, 2 du 2 ^d , 3 du virus.	1 ^{er} vaccin.	22 heures.	+
35	Lapin F après 7 doses de virus.	1 ^{er} vaccin. Id.	22 heures. 48 heures.	+

M. E. Roux a eu l'obligeance de faire, sur ma demande, une expérience de contrôle, et a injecté sous la peau de la cuisse d'un lapin réfractaire quelques gouttes du sang d'un pigeon mort du rouget, diluées avec de l'eau. Le liquide retiré de l'endroit inoculé, 6 heures après l'injection, a donné une culture pure du bacille du rouget.

RECHERCHES SUR L'AMYLASE DE L'URINE

PAR E. DUBOURG.

M. Béchamp a le premier signalé la présence, dans l'urine, d'une diastase capable de saccharifier l'amidon, à laquelle il donna le nom de *néfrozymase*, voulant indiquer par là sa fonction de diastase et son origine rénale¹. Mais, lorsqu'il aborda cette étude, on savait bien peu de chose des transformations subies par l'amidon sous l'influence des amylases; c'est ce qui peut expliquer pourquoi M. Béchamp rechercha seulement les variations de sa diastase sous diverses influences, le sexe, l'âge, le régime, et enfin dans divers cas pathologiques, sans se préoccuper de son rôle physiologique.

Depuis, on a découvert et beaucoup étudié la pepsine contenue dans l'urine, mais on ne s'est guère occupé de l'amylase², et j'ai repris ce sujet, dans l'espoir de contribuer à la solution des problèmes encore si obscurs touchant les transformations provoquées par les diastases de l'organisme.

Une étude préliminaire m'a permis d'établir les meilleures conditions d'expérience.

Pour me mettre à l'abri des invasions microbiennes, je stérilise les liqueurs avec 1/1000 de thymol. Cette dose, très suffisante comme antiseptique, ne gêne pas l'action de l'amylase.

J'emploie directement l'urine et non point la diastase précipitée par l'alcool, parce qu'elle se trouve affaiblie par ce traitement. Pour savoir ce que l'urine en contient, comme il est impossible de la doser directement, puisqu'on nela connaît pas à l'état pur, je l'évalue par la quantité de produits qu'elle forme

1. A. BÉCHAMP, Sur la néfrozymase, matière albuminoïde ferment de l'urine. *Montpellier médical*, 1865.

2. Voir pourtant HOFFMANN dans *Pfluger's Archiv*, t. XLI.

quand on se place toujours dans les mêmes conditions expérimentales pour la faire agir sur l'amidon, et qu'on observe d'ailleurs les précautions recommandées par M. Kjeldahl, dans son étude sur la diastase du malt.

Dans mes expériences, j'ai fait la saccharification à la température de 50°, avec un empois à 5 0/0 thymolisé, et j'ai dosé le sucre réducteur formé après un temps constant de séjour à cette température.

I

Comme l'avait observé M. Béchamp, lorsqu'on ajoute une certaine quantité d'urine à de l'empois d'amidon, on constate toujours la formation de sucre réducteur, et cette transformation de l'empois est bien due à une amylase, car la même urine préalablement portée à 100° perd cette propriété de saccharifier l'amidon.

Mais les quantités de sucre réducteur formées ne sont jamais grandes; en diluant l'urine, il arrive même qu'on peut ne constater que la formation de dextrines, sans apparition de sucre réducteur, même après 24 heures de contact à la température de 50°. Des faits de même nature ont été observés par Payen avec la diastase du malt diluée.

On peut cependant, avec l'amylase de l'urine, transformer complètement en sucre réducteur une quantité notable d'empois d'amidon. Il suffit pour cela d'ajouter de la diastase nouvelle à intervalles rapprochés. Afin d'éviter la dilution des liquides, il faut ici que l'amylase ait été préalablement précipitée. Il est facile de s'assurer que tout l'empois a été transformé en sucre réducteur, en ajoutant à la liqueur une levure pure éprouvée déjà comme incapable de faire fermenter les dextrines¹. On voit que toutes les matières ayant un pouvoir rotatoire disparaissent complètement par la fermentation.

J'ai pu d'ailleurs parvenir au même résultat avec l'amylase du malt, et démontrer qu'il n'y a pas d'achroodextrines inattaquables par les amylases. Nous avions déjà démontré, M. Gayon et moi², que les hydrates de carbone du mout de bière, jusque-là

1. Avant d'ensemencer la levure, j'ai débarrassé les liqueurs du thymol au moyen d'un traitement à l'acétate de plomb, et l'excès de ce métal a été séparé par un courant d'hydrogène sulfuré qu'un courant d'air pur a enlevé ensuite.

2. Fermentation de la dextrine et de l'amidon par les mucors. Ces Annales, 1887.

réputés non fermentescibles, disparaissaient dans la fermentation par les *mucors*; il n'est donc pas nécessaire d'attribuer à ces moisissures une fonction spéciale, l'amylase ordinaire, aidée d'une levure pure, pouvant produire le même phénomène.

L'amylase de l'urine et celle du malt transforment aussi complètement l'embois d'amidon en sucre réducteur, et très rapidement, lorsqu'on fait disparaître le sucre, à mesure qu'il se forme, avec une levure alcoolique.

D'autre part, l'amylase de l'urine saccharifie aussi bien l'amidon cru que l'amidon cuit, mais avec moins d'activité cependant; à l'encontre de la diastase du malt, elle attaque également la féculle de pomme de terre crue.

Enfin, pour en finir avec le rôle de la diastase de l'urine, je dirai qu'elle pousse la transformation de la matière féculente jusqu'au terme glucose. Cette propriété n'appartient pas à l'amylase du malt. De Mering¹ pensait que cette dernière transformait le maltose à la longue, mais M. Bourquelot n'a pas obtenu d'hydratation après 24 heures², et, dans une expérience qui a duré vingt jours, je n'ai pas eu trace de transformation du maltose. M. le D^r Effront³ a trouvé du glucose dans des liqueurs traitées par l'amylase du malt, surtout lorsque l'extrait de malt est introduit sans être clarifié; si M. Effront avait examiné ses liquides au microscope, il les aurait vus peuplés de microbes et aurait eu l'explication toute naturelle de cette apparente anomalie.

Dans l'étude de la transformation du maltose, j'ai adopté les méthodes employées par M. Bourquelot et par M. Gayon et moi.

Lorsqu'on met une solution de maltose cristallisé en présence de l'urine, on observe toujours, après un certain temps, une diminution du pouvoir rotatoire de la liqueur et une augmentation du pouvoir réducteur. Il y a donc bien eu hydratation du maltose. Avec l'urine préalablement chauffée, on ne remarque aucune modification, ce qui prouve que la transformation du maltose est provoquée par l'amylase.

1. DE MERING, Ueber den Einfluss diastatischer Fermente auf Starke, Dextrine and Maltose. *Zeitschr. r. f. phys. Chem.*, 1881.

2. G. BOURQUELOT, Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. *Journal de l'Anatomie et de la Physiologie*, 1886.

3. J. EFFRONT, Contribution à l'étude des produits de la saccharification de l'amidon. *Moniteur scientifique*, mai 1887.

Mais les proportions du maltose hydraté sont toujours faibles. Cela ne saurait surprendre, puisque la diastase est en très faible quantité dans l'urine et qu'on sait, d'autre part, que les produits de saccharification de l'amidon offrent d'autant plus de résistance aux amylases qu'ils approchent plus près du dernier terme de la réaction. C'est ainsi qu'on a démontré que si on sépare les produits dexiriniformes à des temps variés, pendant une expérience, pour les mettre en contact avec une amylase fraîchement préparée, leur résistance va en augmentant. Musculus pensait même que les dernières achroodextrines étaient inattaquables.

Pour expliquer ces faibles transformations, nous devons encore faire intervenir ici les produits de la réaction, qui sont une cause de gêne, on le sait; et enfin il reste l'influence des agents physiques, tels par exemple que l'air, la lumière, etc.

Dans l'organisme, les diastases sont soustraites à toutes ces influences nocives; c'est toujours de la diastase fraîchement sécrétée qui agit; les produits de la réaction sont éliminés à mesure de leur production; en un mot, les conditions sont telles que les transformations doivent attendre leur maximum.

II

Le rôle de l'amylase de l'urine étant établi, j'étudierai maintenant les conditions physico-chimiques et physiologiques de son action.

a. — D'une manière générale elle est soumise aux mêmes conditions physico-chimiques que l'amylase de malt. Le temps, la température produisent des phénomènes absolument comparables.

J'ai pourtant à signaler une particularité intéressante. Si on chauffe à 50°, pendant un certain temps (1, 2, 3 jours), une solution d'amylase, qu'on fait agir ensuite sur de l'embois d'amidon, on trouve qu'elle est moins active qu'une même solution non chauffée au préalable.

M. Kjeldahl avait observé le même fait pour l'amylase du malt, mais à des températures supérieures à 60°. La durée de ses expériences n'a pas dépassé 2 heures. S'il avait prolongé ses essais, il est vraisemblable qu'il aurait obtenu des résultats

pareils aux miens, car je les ai retrouvés avec l'amylase du malt aussi bien qu'avec l'amylase de l'urine.

Je conclus de mon observation que si les produits de transformation de l'amidon, par les amylases, n'augmentent que lentement, lorsque l'expérience se prolonge, un des facteurs qui concourent à ce ralentissement est sans nul doute la température, même lorsque l'expérience se poursuit à celle qui est considérée ordinairement comme la meilleure.

Je me suis assuré d'ailleurs que le phénomène était bien produit par la température, à l'exclusion de l'oxygène de l'air : la même urine qui m'avait servi a été soumise pendant 5 jours à un courant d'air *pur* très actif, au moyen d'une trompe, à la température ordinaire, et les proportions de sucre réducteur qu'elle a fournies, toutes choses égales d'ailleurs, étaient sensiblement les mêmes que celles de l'urine dans une fiole complètement remplie. Cela ne saurait surprendre, car on sait que l'oxygène agit surtout sur les liqueurs alcalines ; or mon urine, acide, était seulement neutralisée au moment du mélange avec l'empois.

b. — J'ai étudié l'influence d'un grand nombre de composés chimiques : acides, bases, sels acides et sels neutres, alcaloïdes, alcools, essences, etc., et de tous mes nombreux essais il se dégage ceci :

Les acides minéraux et organiques, les bases, les sels acides, les sels de métaux lourds enrayeront complètement l'action de l'amylase, à part de très rares exceptions.

Les antiseptiques ordinaires ont une action retardatrice très variable ; le sublimé paralyse complètement l'action de la diastase à la dose de 1/2000^e.

c. — En recherchant l'influence de l'âge et du sexe sur la sécrétion de l'amylase de l'urine, j'ai constaté comme conclusion générale, dans près de 200 essais, que la diastase est en proportion plus considérable dans l'urine de l'homme que dans celle de la femme et de l'enfant ; j'ai observé, en outre, que les vieillards éliminent plus d'amylase que les adultes, et, enfin, que toutes les causes d'affaiblissement provoquent d'ordinaire une hypersécrétion d'amylase.

Mais toutes ces constatations ne peuvent avoir qu'une valeur relative. Nous allons voir en effet l'élimination de l'amylase soumise à l'influence d'un facteur très important : le régime

alimentaire. On comprend dès lors que les expériences faites avec l'urine d'individus soumis à des régimes variés et non comparables ne peuvent fournir que des indications générales et approximatives.

d. — Dans son étude du mécanisme de la sécrétion des diastases en général, M. Duclaux a démontré la part considérable apportée par l'aliment dans la sécrétion des diastases de *l'aspergillus glaucus*, du *penicillium glaucum*, etc.

Mes expériences avec l'amylase de l'urine confirment d'une manière remarquable les conclusions de M. Duclaux.

Les carnivores et les herbivores n'éliminent que des quantités très faibles d'amylase, et les animaux soumis à un régime amylacé en excretent au contraire de notables proportions.

Dans une expérience faite avec un lapin à qui j'ai administré, par périodes assez longues pour bien asseoir l'effet de chaque mode d'alimentation, des aliments variés et définis, j'ai pu suivre les fluctuations de l'amylase, en calculant, chaque jour, la quantité de sucre réducteur formé par l'urine de 24 heures recueillie soigneusement. Tandis que le maximum obtenu sous l'influence du régime *herbacé* s'est trouvé de 12 grammes, je l'ai vu s'elever à 40 grammes avec un régime amylacé. Après 10 jours, on ne trouve plus que des traces d'amylase dans l'urine d'animaux soumis à un régime exclusivement herbacé.

Contrairement à l'opinion de M. Béchamp, on observe des faits de même nature avec un régime exclusivement animalisé.

J'ai obtenu, sur moi-même, une moyenne de 258 grammes de sucre réducteur formé par l'urine de 24 heures, avec le régime amylacé exclusif, tandis que la moyenne du régime animalisé a été seulement de 180 grammes ; et il faut remarquer que l'expérience, dans chacun des cas, n'a duré que 3 jours.

L'élimination de l'urée ne suit pas la même marche que celle de l'amylase. Elle augmente en effet sous l'influence de l'alimentation animalisée et diminue avec le régime amylacé. Avec un régime mixte les courbes des deux éléments sont à peu près identiques, et cela s'explique par la compensation qui s'établit dans la sécrétion des deux éléments.

Si l'on recherche enfin le moment de la journée où l'amylase est en plus grande quantité, on trouve, en général, que c'est dans l'urine de la nuit et dans celle de l'après-midi, nouvelle

preuve de l'influence du régime alimentaire. M. Sahli a consigné les mêmes résultats dans son étude de la diastase digestive de l'urine¹, mais sans pouvoir en fixer les raisons. L'explication devient des plus simple après les observations qui précédent.

III

Maintenant que nous connaissons le rôle physiologique de l'amylase de l'urine et ses conditions d'action, il nous reste encore à rechercher son origine.

a. — M. Béchamp pensait que la *néfrozymase* était sécrétée par le rein ; il n'apporta, il est vrai, aucune preuve à l'appui de ses affirmations ; mais, dans son livre sur les Microzymas, il invoque une expérience de J. Béchamp et E. Baltus qui ont trouvé de la *néfrozymase* dans les uretères d'un chien. Cela pouvait démontrer que la diastase ne se forme pas dans la vessie, mais cela ne prouvait point qu'elle fût sécrétée par le rein.

Les observations qui suivent montreront, je crois, que le rein est aussi étranger à la formation de l'amylase de l'urine qu'à la formation de l'urée.

J'ai comparé tout d'abord les puissances saccharifiantes de l'urine et du rein d'un même animal. Il y a toujours plus d'amylase dans une faible quantité d'urine que dans un rein entier.

Si l'on recueille avec soin l'urine émise par un lapin dans les 24 heures, on trouve chaque fois plus d'amylase que dans le rein entier ; dans certains cas, j'ai vu que l'amylase était en proportion dix fois plus élevée.

Et si l'on soumet un lapin à un régime herbacé pendant une période assez longue, on trouvera encore de l'amylase dans l'urine, et on n'en trouvera que des traces dans le rein.

Quand on étudie l'influence de l'alimentation, on remarque qu'avec un régime herbacé ou animalisé le volume d'urine émise dans les 24 heures est beaucoup plus considérable qu'avec l'alimentation amylacée ; cependant les proportions d'amylase ont diminué considérablement alors que l'urine a augmenté. Si le rein était le siège de la sécrétion de la diastase, il paraît

1. W. SAHLI. *Archiv. für die Gesammte Physiologie*, t. XXVI.

probable que plus la trame de son tissu serait traversée par des volumes croissants d'urine, et plus on devrait trouver d'amylase dans le liquide. C'est le contraire qui arrive.

Enfin les variations observées sous l'influence du régime alimentaire deviennent bien difficiles à expliquer, si on admet la sécrétion par le rein.

b. — Si l'amylase de l'urine n'est pas sécrétée par le rein, encore faut-il pouvoir démontrer que cette matière albuminoïde est susceptible de traverser l'organe.

Il n'y a rien d'impossible à cela, *a priori*, puisque les diastases sont dialysables. On sait, en effet, que la sucrase sécrétée par la levure de bière traverse la membrane de la cellule, et il en est de même de toutes les diastases sécrétées par les moisissures. Nous avons pu, M. Gayon et moi¹, provoquer chez les levures et les moisissures, une hypersécrétion considérable de diastases entraînant avec elles des matières albuminoïdes coagulables. Les champignons n'étaient cependant pas tués par les traitements auxquels nous les avions soumis. Or, ces expériences se rapprochent beaucoup plus des conditions naturelles, au point de vue de la perméabilité des membranes cellulaires de l'organisme, que les essais qu'on peut faire, dans les laboratoires, avec les diverses membranes artificielles.

Je me suis assuré, d'ailleurs, par une expérience directe, que l'amylase de l'urine se dialyse à travers une membrane de par-chemin.

Il est facile, d'autre part, de démontrer que les diastases sont susceptibles de traverser le rein; pour cela, il suffit d'injecter une diastase déterminée dans le système veineux : on la retrouve dans l'urine.

Pour faire ces expériences, j'ai choisi de préférence la sucrase, parce qu'elle n'existe ni dans le rein, ni dans l'urine, à l'état normal du moins, comme je m'en suis assuré directement. Je dois ajouter que M. Béchamp avait constaté son absence dans l'urine.

Une solution de sucrase a été injectée dans la veine fémorale d'un lapin; une heure après, j'ai constaté sa présence dans l'urine. En ajoutant du saccharose à l'urine, il s'est formé, en

1. GAYON et DUBOURG. Sur la sécrétion anormale des matières azotées des levures et des moisissures. *Comptes rendus*, avril 1880.

très peu de temps, des quantités importantes de sucre réducteur. Cette transformation chimique du saccharose était bien due à la sucrase, car une partie de la même urine, préalablement portée à 100°, et additionnée de saccharose après refroidissement, ne transformait pas le sucre même après 24 heures.

Si après avoir injecté une certaine quantité de sucrase dans le sang, on sacrifie l'animal environ une heure après, on trouve toujours de la sucrase dans l'urine de la vessie, mais une proportion plus notable s'est déjà localisée dans le rein. Cette observation permet d'expliquer pourquoi le rein contient ordinairement une fraction sensible de l'amylase de l'urine, et concourt ainsi à démontrer la non sécrétion de la diastase par cet organe.

c. — Puisque le rein n'est pas le siège de la formation de l'amylase, il reste enfin à rechercher la véritable origine de cette diastase.

J'étudierai pour cela l'amylase du sang, et, si je démontre qu'elle possède les mêmes propriétés physiologiques que celle de l'urine, que ses variations sont soumises aux mêmes influences, il me sera sans doute permis de les faire dériver l'une de l'autre. J'irai plus loin : étudiant la diastase du foie, je prouverai que pareille à celle du sang et de l'urine, elle a un rôle et une fonction semblables et qu'elle obéit aux mêmes lois.

L'*amylase du sang*, reconnue par Magendie et Claude Bernard, saccharifie l'empois d'amidon, et, comme l'amylase de l'urine, elle pousse l'hydratation de la matière féculente jusqu'au glucose.

L'*amylase du foie* possède exactement les mêmes propriétés physiologiques.

Dans un travail récent¹, M. Dastre conclut à la non existence d'une diastase isolable, séparable, dans le foie. Cependant, comme il a observé la formation de sucre réducteur, le savant expérimentateur attribue le phénomène à l'activité vitale des cellules hépatiques.

M. Dastre, il est vrai, expérimente à la température de 0°; or, comme l'amylase est en très faible quantité dans le foie, on ne saurait être surpris des résultats négatifs obtenus dans les conditions où il opère.

1. DASTRE, Physiologie du Foie. Recherches sur les fermentes hépatiques. *Archives de Physiologie normale et pathologique*, 1888.

J'ai fait mes essais avec des foies hydrotomisés, selon le procédé indiqué par M. Dastre lui-même ; j'ai même poussé quelquefois les lavages plus loin, et jamais je n'ai pu débarrasser complètement cet organe de l'amylase. Mais au lieu de porter le mélange d'empois et de foie à la glacière, j'expérimentais à 50°, après addition de 1/500^e de thymol, les liquides étant ici plus susceptibles d'altération.

J'ai eu l'occasion de prendre deux parties d'un même foie. L'une était portée à la glacière après addition d'empois, l'autre à 50°; cette dernière seulement me donnait du sucre réducteur.

Avec les foies longuement lavés, on obtient quelquefois des traces seulement de sucre, tandis que si l'on a soin, quand le lavage est commencé depuis quelques minutes, de détacher un des lobes, on y trouve souvent, toutes choses égales d'ailleurs, dix fois plus de sucre réducteur que dans un poids égal de l'organe lavé.

On se trouve, dès lors, en présence de deux hypothèses : ou bien l'amylase est sécrétée par les cellules du foie, ou elle est apportée par le sang.

La diminution de la diastase, sous l'influence du lavage, n'implique pas en effet sa présence exclusive dans le sang. Puisqu'elle est dialysable, elle peut être entraînée par l'eau et traverser les membranes cellulaires, car il se produit évidemment des phénomènes d'osmose pendant le lavage.

Cependant, il est beaucoup plus probable que l'amylase du foie provient du sang; j'appuie cette opinion sur les faibles quantités de diastase qu'on trouve ordinairement dans cet organe même non lavé, mais aussi, et surtout, sur les variations que nous verrons se produire sous l'influence du régime alimentaire.

En ce qui concerne son rôle physiologique, peu importe que l'amylase soit sécrétée par les cellules hépatiques ou apportée par le sang; dans ce dernier cas, rien n'empêche d'admettre que les échanges osmotiques continuels, qui s'opèrent entre le sang des capillaires et les liquides des tissus dont il parcourt la trame, doivent permettre à la diastase de traverser les membranes et de se trouver en présence du glycogène localisé dans le foie.

Comme l'avait vu Claude Bernard, le foie contient donc

une amylase, et cette amylase transforme la matière féculente en glucose.

Mais les deux amylases du sang et du foie varient avec le régime alimentaire comme l'amylase de l'urine.

Avec le régime herbacé, prolongé un certain temps, on peut arriver à faire disparaître à peu près complètement l'amylase du sang et du foie, comme nous l'avons vue disparaître du rein.

Voici une expérience faite avec les organes de 2 lapins, soumis depuis huit jours au régime indiqué. J'ai ajouté le rein et l'urine, afin que la comparaison fût complète.

Les chiffres indiquent les quantités de sucre réducteur après 24 heures d'étuve à 50°.

	LAPIN N° 1 Régime amylacé.	LAPIN N° 2 Régime végétal (herbacé).
Sang.	4 gr. 05	0 gr. 62
Foie non lavé	1 gr. 32	traces.
Foie lavé . .	0 gr. 42	traces.
Rein.	4 gr. 93	traces
Urine	4 gr. 45	0 gr. 37

Les essais ont été faits avec 10° de sang, 10 grammes de foie, un rein entier, 10° d'urine.

J'ai trouvé dans la vessie du premier lapin 70° d'urine. Ce volume aurait donné, dans les mêmes conditions, 12 gr. 25 de sucre réducteur; l'urine trouvée dans la vessie du second (45°) eût fourni seulement 1 gr. 67.

Cette expérience montre bien que l'alimentation n'influe pas seulement sur l'amylase de l'urine, la sécrétion de la diastase du foie, du sang est également atteinte.

Si, réunissant tous les faits qui précédent, et se reportant aux expériences très précises de M. Bourquelot concernant les amylases du pancréas et de l'intestin, on remarque que toutes ces diastases ont les mêmes propriétés physiologiques, il sera permis de se demander si elles n'ont pas la même origine : les viscères abdominaux.

Mais des expériences qui précédent se dégagent aussi une nouvelle conclusion ; puisque toutes ces amylases poussent l'hydratation de la matière féculente jusqu'au glucose, elles expliquent la nature du sucre du diabète.

On trouve en effet constamment du glucose seul dans l'urine des diabétiques. J'ai eu l'occasion d'examiner un nombre considérable de ces urines, et jamais je n'y ai trouvé de maltose.

Lorsqu'on fait agir des urines de diabétique sur l'empois d'amidon ou sur des solutions de maltose, on remarque que les transformations sont ordinairement faibles, et d'autant moins sensibles que le diabète présente un caractère plus grave. On pourrait sans doute trouver une explication à ces anomalies apparentes, mais ceci est en dehors du cadre de mon travail actuel.

Quant à la nature du sucre conteau dans le sang, il semble qu'il soit plus malaisé de se prononcer. C'est probablement du glucose, mais rien n'empêche de supposer qu'il puisse y avoir un mélange des deux sucres, comme l'ont affirmé Musculus et de Mering.

Quelques expériences tentées dans le but d'élucider le problème n'ont pu me fournir que des résultats douteux. Si on provoque la glycosurie chez divers animaux, au moyen d'injections de glucose, on trouve toujours du glucose seul dans l'urine. Je l'ai observé dans 4 expériences.

Le diabète expérimental obtenu avec la phlorizine conduit aux mêmes résultats, comme l'ont observé récemment MM. Germain Sée et Gley¹.

Une seule fois, j'ai obtenu un résultat douteux : j'avais injecté à un lapin de l'eau de levure, pour me rendre compte du passage de la sucrase à travers le rein; l'animal eut une glycosurie passagère, et la rotation et la réduction de la matière sucrée, calculée en glucose, me fournirent des résultats assez sensiblement discordants. Malheureusement, il m'a été impossible de provoquer de nouveau la glycosurie avec l'eau de levure.

D'ailleurs, tant qu'on n'aura pas pu parvenir à isoler le sucre du sang, il restera un doute à ce sujet. MM. Dastre et Bourquelot, en opérant avec 5 litres de sang, ont obtenu une matière réductrice qui, d'après eux, aurait pu être transformée en glucose, par suite des manipulations subies par les liqueurs, dans le cas où il y aurait eu du maltose. J'ai moi-même fait un essai avec 20 litres de sérum de sang de bœuf; j'ai obtenu une matière

1. GERMAIN SÉE et GLEY. *Comptes rendus*, février 1889.

réductrice très dosable, puisqu'elle correspondait à 6 gr. 80 par litre, calculée en glucose; mais, chose singulière, j'avais en même temps une légère rotation gauche que ni la chaleur ni les acides n'ont pu faire disparaître. Je l'ai attribuée à une matière albuminoïde.

Il reste donc là une lacune, que des difficultés expérimentales particulières rendent très difficile à combler.

En résumé, la néfrozymase de M. Béchamp est une amylase poussant l'hydratation de l'amidon jusqu'au glucose, et ce caractère la distingue de l'amylase de l'orge germé. L'étude des conditions physiologiques de l'action de cette diastase m'a permis de confirmer les expériences de M. Duclaux, concernant le mécanisme de la sécrétion des diastases.

Enfin, si l'on rapproche les diverses propriétés de l'amylase de l'urine de celles des autres amylases de l'organisme, on est conduit à leur attribuer une origine commune : les viscères abdominaux.

Si l'on admet, avec M. Duclaux¹, que dans l'acte de la digestion intestinale, la part des diastases sécrétées par les microorganismes est au moins comparable, pour sa puissance, à celle des diastases provenant des liquides normaux de l'organisme, on peut se rendre compte, d'après les recherches qui viennent d'être exposées, du rôle considérable joué par les microbes dans les phénomènes généraux de la nutrition.

Ce travail a été fait sous la direction de mon savant maître M. Gayon; je suis heureux de pouvoir le remercier publiquement de ses utiles et affectueux conseils.

1. DUCLAUX, Recherches sur la digestion. *Comptes rendus*, 1882. *Microbiologie*, page 804.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR L'ACTION ANTISEPTIQUE DES ESSENCES,

PAR MM. CADÉAC ET ALBIN MEUNIER.

Depuis qu'on a montré avec tant d'évidence quel rôle important les micro-organismes jouent dans la production et la dissémination des maladies, comme dans la décomposition des substances organiques, les expérimentateurs ont cherché quelles substances tuent les différents microbes ou empêchent leur évolution, sans toutefois altérer les cellules du malade et modifier profondément la structure des tissus. Beaucoup d'agents chimiques ont été étudiés : l'acide phénique, le sublimé corrosif, l'acide borique, le sulfate de cuivre, l'iodeforme, etc., et maintenant on peut dire que, grâce à ces microbicides, toutes les audaces sont permises aux chirurgiens, puisqu'elles sont le plus souvent couronnées de succès.

A la suite de ces découvertes, la thérapeutique médicale a voulu, elle aussi, utiliser les microbicides et les antiseptiques. Mais les résultats obtenus ont été peu saillants, soit en raison du peu de solubilité ou de diffusion dans l'organisme des produits employés, soit à cause de leurs propriétés toxiques ou caustiques. On peut donc dire que l'antisepsie médicale est toute à faire.

Le but idéal à atteindre serait de trouver un spécifique comparable au sulfate de quinine contre l'intoxication palustre, et au mercure contre la syphilis. Dès lors, la recherche de nouveaux microbicides nous a tentés, et il nous a paru intéressant à ce point de vue d'étudier les antiseptiques employés autrefois en chirurgie et en médecine chez les Égyptiens, les Grecs et les Romains, d'en déterminer, avec les méthodes nouvelles, les propriétés spéciales contre les divers microbes pathogènes, et de les comparer avec les substances antiseptiques les plus usitées de nos jours.

L'examen des momies prouve suffisamment que les Égyptiens ont connu des antiseptiques très énergiques. Ainsi Czermack,

en faisant des recherches anatomiques sur deux momies qui avaient plus de 3,000 ans, les trouva si bien conservées qu'il put reconnaître au microscope des fragments d'intestin. Or, tous les procédés employés par les Égyptiens pour embaumer les corps se résument dans le suivant : introduction dans le corps de poudres aromatiques, de baume, de résines aromatiques et d'essences pures ; puis immersion dans l'eau salée, et application sur le corps de bandelettes trempées dans des résines saturées d'essences. Ce sont donc les essences qui ont conservé les momies. D'ailleurs, Hunter est arrivé à embaumer des corps et à leur donner l'apparence de momies en injectant dans les artères et dans les viscères une solution de térébenthine de Venise dans des essences de lavande, de romarin, de camomille et de térébenthine. Les huiles, les vins aromatiques, les onguents faits avec des oléo-résines à essences, en un mot, les mêmes produits qu'on employait en Egypte pour embaumer les corps, constituent la base des différents pansements dont usaient les médecins de l'antiquité et ceux qui les premiers se sont occupés de chirurgie, depuis Hippocrate, Celse, Galien, Actius, Paul d'Égine, jusqu'à Ambroise Paré et Fabrice d'Aquapendente.

Passons-nous de la chirurgie à la thérapeutique médicale, après avoir fouillé tout le chaos de la polypharmacie des anciens, nous retrouvons dans la composition de la thériaque d'Andromaque toutes les drogues dont les vertus ont été successivement vantées par les médecins de l'antiquité, et chantées par les poètes.

Cet électuaire célèbre, imaginé par le médecin de Néron, contenait les 54 substances reconnues par la méthode empirique pour être les plus actives, et était destiné à guérir toutes les maladies. La thériaque a joui d'une vogue telle que, conseillée par tous les médecins, sa formule a traversé tous les siècles pour arriver jusqu'à nous, et qu'elle a même été regardée par le savant Bordeu comme le remède par excellence. Or, nous voyons qu'elle est composée de : sulfate de fer, poudre d'opium; quelques substances amères tanniques, et de 42 substances aromatiques actives par leurs essences.

Ainsi, les essences ont été les antiseptiques connus et employés par les anciens. La médecine populaire a hérité de ces vieilles traditions; les plantes aromatiques fournissent encore

aujourd'hui les éléments les plus importants de cette thérapeutique. D'autre part, beaucoup d'essences sont encore employées comme condiments, beaucoup d'autres sont utilisées dans la parfumerie. N'est-il donc pas intéressant de vérifier par les nouvelles méthodes expérimentales la valeur réelle de ces produits consacrés jusqu'ici par l'empirisme?

Des tentatives dans ce sens ont du reste été faites. M. Chamberland, dans un mémoire remarquable (voir *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1887), a démontré que les vapeurs d'essence ont sensiblement la même propriété antiseptique que les essences elles-mêmes agissant par contact direct. Mais nous avons cru devoir employer une méthode différente.

Nous avons enduit d'une culture, sur gélose, du microbe à étudier, l'extrémité d'un fil de platine préalablement passé à la flamme, puis ce fil a été plongé dans l'essence pendant un temps variable. Avec le fil portant la culture ainsi modifiée par l'essence nous avons ensemencé des tubes de gélose, qui ont été ensuite placés dans une étuve à 37°. La gélose est une substance qui ne se mélange pas avec les essences, et la goutte d'essence apportée par le fil reste à la surface; mais bientôt elle s'évapore, et, si les microbes n'ont pas été tués, la culture se fait.

Nous avons renouvelé nos essais un grand nombre de fois pour chaque essence, en égalisant autant que possible les quantités de semence emportées par les fils de platine, et ne faisant varier que le temps de leur contact avec l'essence.

Notre but a été d'établir ainsi une échelle de l'action antiseptique des essences basée sur la durée de leur contact avec les microbes. Certains expérimentateurs ont eu recours au procédé des émulsions pour obtenir la solubilité des essences. Cet artifice présente le double inconvénient d'introduire des éléments étrangers comme l'alcool et la saponine employés pour produire l'émulsion, et de créer ainsi un milieu variable et imparfait. C'est pourquoi il nous a semblé préférable de prendre le temps comme terme de comparaison, évitant encore du même coup les nombreuses causes d'erreur qui s'introduisent dans l'expérimentation avec des doses infinitésimales.

Parmi les nombreux microbes qui s'offraient à nous comme objet d'étude, nous avons choisi en premier lieu celui de la fièvre typhoïde et celui de la morve pour comparer les actions

des différents microbicides les plus usités de nos jours avec les actions des essences.

C'est ce tableau comparé que nous présentons aujourd'hui :

A. — ÉTUDE DU MICROBE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE

I. — ACTION DES ANTISEPTIQUES LES PLUS USITÉS DE NOS JOURS

Le sublimé à $\frac{1}{1000}$	·	tue le microbe en	40 minutes.
L'éther iodoformé saturé.	·	—	36 heures.
La solution de sulfate de cuivre à 20/0	·	—	9 jours.
— d'acide phénique à 5 0/0	·	—	9 —
— d'acide borique à 4 0/0	·	—	41 —
— d'acide phénique à 4 0/0	·	—	42 —

II. — ACTION DES ESSENCES

A. — Essences qui tuent le microbe après un contact de moins de 24 heures :

Cannelle de Ceylan.	·	le tue au bout de	42 minutes.
Girofle.	·	—	25 —
Eugénol.	·	—	30 —
Thym.	·	—	35 —
Serpotet.	·	—	35 —
Verveine des Indes.	·	—	45 —
Géranium de France.	·	—	50 —
Origan ou dictame de Crète.	·	—	75 —
Patchouly.	·	—	80 —
Zédoaire.	·	—	2 heures.
Absinthe.	·	—	4 —
Santal.	·	—	12 —
Cédrat.	·	—	22 —

Si nous comparons ce tableau A au tableau I, nous trouvons que la solution de sublimé à 1/1000 tient le premier rang, mais que l'essence de cannelle a une puissance antisceptique sensiblement égale, puisque la première tue le microbe en 40 minutes et la seconde en 42 minutes.

La comparaison faite avec les antiseptiques modernes, tels que : solution d'acide borique, d'acide phénique, de sulfate de cuivre et d'iodoforme, est tout en faveur des essences : beaucoup d'entre elles empêchent l'évolution du microbe après quelques minutes ou quelques heures ; les autres antiseptiques n'agissent qu'au bout de plusieurs jours.

Remarquons que la cannelle de Ceylan était très employée par les Égyptiens dans les embaumements, et qu'elle entrait dans la composition de la thériaque.

Le girofle n'était pas connue des Grecs ni des Latins. Paul d'Egine est le premier qui en parle. Cependant Caillaud dit avoir trouvé un collier de clo us de girofle dans un sarcophage antique.

Le thym et le serpolet ont été utilisés de tout temps dans la médecine populaire, et pour la conservation des bouillons et des viandes.

La verveine des Indes est très utilisée encore de nos jours en infusion théiforme; ses propriétés antiseptiques ne sont pas encore assez connues.

L'origan ou dictame de Crète a été employé dans les temps héroïques de la Grèce comme vulnéraire. Virgile en parle dans son *Enéide*, livre XII.

La place occupée par l'origan dans le tableau précédent justifie la croyance à ses propriétés merveilleuses.

B. — Essences qui tuent le microbe entre 24 et 48 heures :

Cumin	après un contact de	27	heures.
Cary.	—	27	—
Genièvre.	—	29	—
Matico.	—	29	—
Galbanum.	—	29	—
Mélisse.	—	30	—
Valérian.	—	32	—
Citron.	—	32	—
Angélique.	—	33	—
Céleri.	—	36	—
Cigue aquatique (Phellandrie).	—	36	—
Sabine.	—	36	—
Copahu.	—	37	—
Poivre.	—	43	—
Térébenthine.	—	43	—
Opopanax.	—	47	—
Rose.	—	48	—
Camomille.	—	48	—
Aunée.	—	48	—
Ether iodoformé saturé. . . .	—	36	—

Ce deuxième tableau nous montre que l'éther iodoformé ne tient que le septième rang, et cependant, entre les mains des professeurs Bouchard et Renaut, il est devenu l'antiseptique préféré dans le traitement de la fièvre typhoïde. Nous trouvons avant lui le genièvre, le galbanum, déjà employés dans les

embaumements. Les Égyptiens enduisaient le corps d'essence de genièvre avant l'application des bandelettes. Le galbanum, l'opopanax, la térébenthine étaient les principales oléo-résines injectées dans les viscères après dissolution dans les essences. La valériane, le citron, le poivre et la térébenthine entraient dans la thériaque.

C. — Essences qui agissent après un contact de 2 à 4 jours :

Badiane.	50 heures.
Semen-contra.	50 —
Encens.	52 —
Sassafras.	52 —
Tubéreuse.	60 —
Coriandre.	70 —

L'encens est de ces essences la seule employée par les Égyptiens. Il entre dans la thériaque. Il est plus actif que la solution de sulfate de cuivre à $\frac{2}{400}$ contre le microbe d'Eberth.

D. — Essences qui tuent le microbe entre 4 et 10 jours.

1^o Entre 4 et 5 jours :

- Calamus aromaticus.
- Estragon.

Le *calamus aromaticus* a une puissance antiseptique sensiblement supérieure à celle de la solution d'acide phénique à 5 0/0. Il est un des composants de la thériaque.

2^o Entre 6 et 8 jours :

Sabine.	Bucco.
Fenouil.	Cascarille.
Macis.	Orange de Portugal.
Sauge.	Hysope.

Remarquons que le fenouil entre dans l'électuaire d'Andromaque, et que la sauge était *l'herbe sacrée de Lesbos*.

3^o Entre 8 et 10 jours :

Menthe.	Laurier d'Apollon.
Muscade.	Myrte.
Romarin.	Linaloë.
Carotte.	Aspic.
Moutarde.	Eucalyptus.
Anis.	Bois de cèdre.
Ail.	Cajeput.
Marjolaine.	Wintergreen
Amandes amères.	Camphre.
Laurier-cerise.	

Une solution d'acide phénique à 1 0/0 n'agit qu'au bout de 12 jours de contact. Nous voyons dans cette colonne beaucoup d'aromates très vantés comme antiseptiques, et dont l'action est égale ou supérieure à celle de la solution d'acide phénique à 5 0/0.

Les anciens employaient dans les embaumements l'essence de bois de cèdre.

E. — Essences qui n'agissent pas après 10 jours de contact :

Basilic.	Rue.
Houblon.	Tanaisie.
Panais.	Boldo.

Ces six essences, les moins actives de notre échelle, ont cependant une puissance antiseptique égale à celle d'une solution d'acide borique à 4 0/0.

B. — ÉTUDE DU MICROBE DE LA MORVE

Nous avons répété sur le microbe de la morve les expériences faites sur le microbe d'Eberth, en restant fidèles à notre méthode.

I. — ACTION DES ANTISEPTIQUES LES PLUS USITÉS DE NOS JOURS

Le sublimé corrosif à $\frac{1}{4000}$	tue le microbe en	15 minutes.
Solution d'acide phénique à 5 0/0 ..	—	—	30 heures.
— d'acide phénique à 1 0/0 ..	—	—	45 —
Iodoforme.....	—	—	3 jours.
Solution d'acide borique à 4 0/0 ..	—	—	4 —
— de sulfate de cuivre à 2 0/0	—	—	10 —

II. — ACTION DES ESSENCES

A. — Essences qui tuent le microbe après un contact de 24 heures :

Cannelle de Ceylan. . . .	après 15 minutes de contact.		
Girofle.	—	35	—
Thym et serpolet. . . .	—	38	—
Verveine des Indes. . . .	—	38	—
Patchouly.	—	40	—
Géranium de France. . .	—	50	—
Origan (dictame de Grèce)	—	80	—

B. — Essences qui tuent le microbe après un contact compris entre 2 et 24 heures :

Citron	après un contact de 6 heures.	
Cubèbe.	—	6 —
Assa-fœtida.	—	7 —
Copahu.	—	10 —
Santal.	—	12 —
Cédrat.	—	12 —
Ciguë aquatique (Phellandrie)	—	17 —
Tubéreuse	—	20 —
Zédoaire	—	20 —

C. — Essences qui agissent entre 24 et 48 heures :

Carvi	24 heures de contact	belle culture.
	48	pas de culture.
Cumin	24	— belle culture.
—	48	— pas de culture.

D. — Essences qui tuent le microbe de la morve après un contact compris entre 2 et 4 jours :

Racines d'angélique	au bout de	2 jours 1/2.
Bergamote	—	2 jours 1/2.
Semen-contra.	—	60 heures.
Galbanum.	—	66 —
Matico.	—	66 —
Térébenthine et térébenthène.	—	67 —
Rose.	—	70 —
Coriandre.	—	3 jours 1/2.
Genièvre.	—	84 heures.

E. — Essences qui tuent après un contact variant de 4 et 10 jours :

Calamus aromaticus	après	5 jours.
Galanga.	—	7 —
Fenouil.	—	7 —
Sabine.	—	7 —
Opoponax.	—	8 —
Macis.	—	8 —
Sauge.	—	8 —
Persil.	—	9 —
Néroli.	—	9 —
Petit grain.	—	9 —
Cascarille.	—	10 —
Romarin.	—	10 —
Bucco.	—	9 —
Hysope.	—	8 —

Carotte	—	10	jours.
Moutarde.	—	10	—
Ail.	—	10	—
Encens.	—	9	—
Elèmi.	—	9	—
Estragon.	—	5	—
Camphre.	—	9	—
Absinthe.	—	9	—
Menthe.	—	10	—

F. — *Essences qui tuent après un contact compris entre 10 et 15 jours :*

Amandes amères au bout de	11	jours.	
Marjolaine.	—	12	—
Sassafras	—	13	—
Laurier-cerise. . .	—	13	—
Serpentaire.	—	13	—
Myrrhe.	—	14	—
Linaloë.	—	14	—
Muscade.	—	15	—

G. — *Essences qui ne tuent qu'après un contact de 15 jours :*

Myrte.	Cajeput.
Aunée.	Tanaisie.
Panaïs.	Lavande.
Eucalyptus.	Houblon.
Gingembre.	Bois de cèdre.
Basilic.	Camomille.
Rue.	Aspic.
Badiane.	Wintergreen.
Boldo.	Laurier d'Apollon.
Anis vert.	Noyaux de cerises.

En comparant les essences avec les antiseptiques employés de nos jours, nous voyons qu'en face du microbe de la morve, l'avantage n'est pas aux essences. La puissance antiseptique des essences reste la même contre le microbe de la morve ou contre le microbe typhogène; mais celle des antiseptiques minéraux est de beaucoup supérieure à celles qu'ils possèdent contre le microbe de la fièvre typhoïde.

Comme résultat de ce travail, constatons que chaque essence est un antiseptique aussi puissant contre le microbe typhogène que contre le microbe morvigène. Ce pouvoir varie d'une essence

à l'autre, pour devenir avec quelques-unes sensiblement égal à celui des antiseptiques chimiques les plus employés, tels que le sublimé, l'iodoforme, le sulfate de cuivre, etc. Nos conclusions confirment le travail déjà cité de M. Chamberland. Nous en sommes d'autant plus heureux qu'il a expérimenté sur un autre genre de microbe, la bactéridie charbonneuse, et en employant une méthode différente de la nôtre. Il a étudié l'action des essences soit à l'état de vapeur, soit par contact direct en usant du procédé des émulsions, et il arrive à les classer ainsi d'après leur degré d'efficacité :

Cannelle de Ceylan.	Angélique.
Origan.	Genièvre.
Girofle.	Vespetro.
Géranium.	

Nous en retrouvons la plupart dans notre premier tableau; le genièvre et l'angélique figurent dans le second, mais sont encore des plus actifs. Bien que l'essence de vespetro soit présentée comme très active par ses vapeurs, nous l'avons laissée de côté, parce qu'elle est un composé d'angélique, de coriandre, d'anis et de fenouil. Nous avons toutefois remarqué que ses propriétés antiseptiques sont plus grandes que la somme algébrique des propriétés de chacune des essences composantes. Peut-être y aura-t-il un grand intérêt à étudier les propriétés microbicides des mélanges.

Ne soyons donc plus surpris que les Égyptiens aient pu à l'aide d'essences et de parfums prévenir la putréfaction des corps. Nous retrouvons aussi dans la thériaque d'Andromaque la plus grande partie des essences étudiées et reconnues par nous comme les plus actives.

L'antisepsie médicale n'est donc pas d'origine récente : s'ils ignoraient le mot, les anciens pratiquaient du moins la chose, et la science moderne semble bien leur donner pleinement raison. Aussi croyons-nous qu'une étude des substances aromatiques au point de vue de leur action physiologique aurait pour effet de les remettre en faveur et d'enrichir l'antisepsie de produits très actifs et trop dédaignés.

LETTRE DE M. WYSSOKOWICZ A M. DUCLAUX.

« Monsieur,

« Les deux articles que M. Gamaleïa a publiés dans le numéro d'octobre 1888 des *Annales* me semblent exiger de ma part une courte réponse.

« Je laisse tout de suite de côté le ton peu courtois de la note de la page 548, dans laquelle M. Gamaleïa, sans rien citer de l'article auquel il fait allusion, et s'adressant à des lecteurs destinés, pour la plupart, à ne pas le connaître, le présente comme une réclamation de priorité soit vis-à-vis de M. Metchnikoff au sujet de la phagocytose, soit vis-à-vis de l'école de M. Pasteur au sujet des vaccins chimiques. Dans aucun de mes travaux, je n'ai eu la prétention de revendiquer la découverte de la théorie des phagocytes avant M. Metchnikoff. Dans mon article du numéro 1 du *Zeitschrift f. Hygiene*, puis dans l'article du *Wratch* (n° 39, 1887) « sur les causes de la suppuration », j'ai soutenu et démontré par des faits, avant que M. Metchnikoff n'eût créé ses macrophages, que la lutte contre les microorganismes n'est pas le fait des globules blancs (leucocytes), mais bien des éléments cellulaires du tissu conjonctif, auxquels M. Metchnikoff a donné depuis tant d'importance.

« Au sujet de cet autre reproche que me fait M. Gamaleïa, d'avoir employé un lapin comme témoin pour contrôler la virulence d'un virus charbonneux destiné à des moutons, je dois faire observer que si M. Skadowski a agi ainsi, c'était par économie, et parce que l'épreuve lui semblait d'ailleurs peu nécessaire; cette expérience était du reste un premier essai, et, en poursuivant ce sujet, M. Skadowski¹ a pris comme témoins non des lapins, mais des moutons. Il a trouvé ainsi qu'on peut, à l'aide des vaccins stérilisés de M. Cienkowski, obtenir l'immunité du mouton contre le charbon, mais cette immunité n'est pas aussi durable qu'avec le vaccin ordinaire. De plus, la dose du vaccin stérilisé y joue un grand rôle. Ce sont à peu près les mêmes résultats que ceux de MM. Roux et Chamberland.

« Pour se montrer un critique aussi sévère, il faut être inattaquable soi-même. M. Gamaleïa est-il bien sûr de ne pas s'être trompé quand

1. *Wratch*, numéros 9 et 10, 1889.

il a vu les bacilles du vaccin charbonneux, introduits en injections sous-cutanées chez un animal, se multiplier au point d'inoculation, passer dans le sang, former des dépôts dans les organes, le foie, la rate, les reins, et s'éliminer avec l'urine ? Je n'ai au moins jamais rien vu de pareil, ni M. Chalachnikoff dans ses expériences sur les moutons, ni M. le Dr Bitter dans le laboratoire de M. Flügge, et cela bien que M. Chalachnikoff et moi ayons employé, parallèlement à la méthode des cultures, celle des observations microscopiques, que M. Gamaleïa me reproche d'avoir négligée.

« Ce n'est pourtant pas que je veuille établir comme une loi absolue l'impénétrabilité des membranes animales pour les bactéries, comme M. Gamaleïa se l'imagine.

« Mes recherches montrent seulement que les membranes saines ne se laissent pénétrer ni par les bactéries, ni par les substances granuleuses qui se trouvent dans le sang. A l'état normal, il n'y a introduction ni dans l'urine par les reins, ni dans l'intestin par ses parois. J'ai montré aussi qu'il y a des bactéries pouvant former des foyers d'infection dans les reins, et qu'on peut y retrouver à l'aide du microscope et des cultures. Tels sont le *staphylococcus aureus*, le bacille tuberculeux de Koch, et aussi le *bacillus anthracis*. Ce qui n'empêche pas pourtant que la loi de l'impénétrabilité des membranes saines ne soit vraie aussi pour le charbon. Les bacilles charbonneux, injectés dans le sang, s'éliminent peu à peu, passent dans les organes, le foie, la rate, dans la moelle des os. Dans les reins, ils sont peu nombreux et on n'en trouve pas dans les urines, même 10 à 15 heures après l'injection. Quand on en rencontre, ce n'est qu'après l'établissement dans les reins de foyers d'infection bacillaire, ouvrant passage dans les canalicules urinaires.

« Pour le tube digestif, j'ai indiqué plusieurs bactéries, qui, sans être pathogènes, sont douées de propriétés toxiques. Injectées dans le sang à fortes doses, elles déterminent chez les chiens et chez les lapins des phénomènes d'intoxication, souvent suivis d'extravasation dans les parois intestinales. C'est seulement dans ce dernier cas que j'ai pu découvrir, dans le canal intestinal, ces mêmes bactéries. J'ai vu que le même effet se produit pour le foie. Les bactéries n'entrent pas dans la bile par les voies sanguines.

« Toutes ces affirmations se trouvent dans mes articles du numéro 1 du *Zeitschrift f. Hygiene* 1886. Il suffit de les consulter pour se convaincre de l'erreur de M. Gamaleïa au sujet de l'opinion qu'il m'attribue.

« Permettez-moi d'ajouter quelques mots au sujet de l'immunité que confère la vaccination charbonneuse de M. Pasteur.

« Je pars de cette notion que toute culture d'un microbe pathogène

fournit des substances nuisibles aux éléments des tissus. Ces substances, variables d'une affection à l'autre, peuvent varier aussi par leur mode de pénétration dans les éléments qu'elles atteignent, par la façon dont elles les atteignent, etc. Avec le vaccin charbonneux, qui ne donne qu'une maladie légère, le bacille ne pénètre ni dans le sang ni dans les organes, ne se multiplie même, d'après M. Bitter, que faiblement au point d'inoculation, et y périt au bout de 24 heures, il n'y a qu'une seule manière d'expliquer l'élévation de température chez les animaux vaccinés, et leur immunité, c'est d'admettre que la fièvre et l'immunité sont dues à la pénétration dans le sang des produits vitaux des bacilles. C'est une explication qui est d'accord avec mes expériences sur l'immunité conférée par des vaccins stérilisés et avec les résultats de MM. Roux et Chamberland, obtenus avec du sang stérilisé d'animaux morts du charbon.

« Si l'immunité que j'ai produite dans mes expériences est moins durable qu'avec des vaccins non stérilisés, cela peut s'expliquer soit par la modification subie pendant la stérilisation par les substances toxiques, soit par leur absorption plus rapide dans le sang, ou leur élimination plus rapide par les urines. Le vaccin non stérilisé n'a pas besoin d'être introduit à des doses aussi fortes, mais il a pour lui le temps, qui lui permet de produire la dose vaccinale.

« Dans l'action qu'il exerce ainsi sur les éléments cellulaires, je vois une certaine analogie avec le vulgaire phénomène de l'habitude. C'est ainsi qu'on s'habitue à la morphine, à l'arsenic, et à cette habitude correspond certainement une modification du protoplasme des éléments cellulaires. Ce protoplasme réagit d'abord énergiquement contre la substance toxique, mais quand il arrive à pouvoir la supporter, il peut en absorber des quantités considérables. C'est l'analogue de l'immunité acquise; quant à l'immunité naturelle, nous avons l'exemple des animaux qui sont presque indifférents à la morphine. J'ai vu, par exemple, des pigeons supporter, sans accoutumance préalable, l'injection dans les muscles pectoraux de 12 centigrammes de morphine dans 3^{cc} d'eau. Nous ne pouvons distinguer morphologiquement le protoplasme des cellules du pigeon de celui de l'homme; il doit pourtant exister entre eux une grande différence.

« La nature du poison, le mode d'administration, la durée de l'accoutumance, la nature de l'animal jouent dans cette question de mithridatisme le même rôle que dans les immunités morbides.

« Ces analogies ont été indiquées par quelques savants; je sais bien qu'en général des analogies seules sont une base fragile pour asseoir une hypothèse. Mais si cette hypothèse ainsi basée sert de point de départ à de nouveaux travaux, et groupe dans une même direction les

efforts de plusieurs savants, quand le sujet est trop étendu pour être abordé par un seul homme, il n'y a pas d'inconvénient à la risquer. Je désire attirer l'attention sur la nécessité d'étudier l'accoutumance de l'organisme contre les poisons, qui nous apprendra certainement des faits très intéressants, relatifs à la vie du protoplasme, et nous aidera à comprendre l'immunité. J'ai déjà commencé sur ce sujet quelques expériences dont je communiquerai bientôt les résultats.

« Je voudrais préciser en terminant la signification de l'accoutumance dans la lutte contre l'infection. Un microbe n'étant pathogène que parce qu'il peut, en se développant en un point favorable, agir à l'aide de ses toxines sur les fonctions des cellules, en amoindrissant ou en anéantissant leur faculté de réaction, peu importe qu'il pénètre dans les éléments cellulaires protoplasmatisques ou qu'il n'agisse que de loin sur eux par ses produits. Dans les deux cas, en supprimant les résistances autour de lui, en se multipliant, ce microbe élargira son rayon d'action jusqu'au moment où, pénétrant dans les vaisseaux, il infectera l'organisme entier. Dans l'immunité, la réaction locale est beaucoup moins intense, les cellules ne se nécrosent pas, et les bactéries périssent soit par l'action des sucs organiques (Nuttall), soit par l'action du temps. C'est là que l'accoutumance doit rendre des services, d'autant plus grands qu'elle n'a pas besoin d'augmenter beaucoup la puissance de réaction des tissus. Il ne s'agit pas d'obtenir des effets comparables à ceux qu'on réalise dans l'accoutumance à la morphine, par exemple, pour laquelle, en commençant par 1 centigramme, on peut monter à 2^{gr} et plus. D'aussi grandes variations sont inutiles et il suffit d'un très faible changement dans le protoplasme des cellules de l'animal vacciné pour que le microbe introduit au point d'inoculation n'y trouve pas de conditions favorables à son développement.

« Veuillez agréer, etc. »

REVUES ET ANALYSES

S. KITASATO. Sur le bacille du charbon symptomatique et sur sa culture. *Zeitschrift für Hygiene*, vol. VI, p. 105.

L'auteur a fait ses cultures dans du bouillon de cobaye, de bœuf, où le bacille du charbon symptomatique croissait avec abondance. Sa végétation était beaucoup moins riche dans les bouillons préparés avec les muscles frais de lapin, de veau et de poule.

M. *Kitasato* n'a obtenu ses cultures que dans un bouillon faiblement acidé ; une fois neutralisé ou rendu alcalin, ce milieu ne permet plus la croissance des bacilles.

Le sérum liquide ou solidifié, les pommes de terre et les autres milieux solides n'ont jamais donné de cultures du bacille charbonneux. Pour les obtenir ; il faut donc toujours recourir au bouillon qui doit être placé dans une atmosphère d'hydrogène, vu que la bacille purement anaérobie du charbon symptomatique ne croît jamais dans l'acide carbonique.

Les cultures obtenues par M. *Kitasato* étaient bien virulentes, mais ne restaient telles que pendant peu de temps, de sorte qu'elles devaient être renouvelées tous les huit jours. Ces cultures étaient pathogènes pour les cobayes et pour plusieurs souris, mais non pour les lapins.

Après avoir observé que les bacilles des cultures ainsi que ceux de la sérosité des animaux morts du charbon symptomatique perdaient leur virulence lorsqu'on les conservait sur des fils de soie, beaucoup plus vite que dans des couches épaisses de viande, M. *Kitasato* pense que les corps réfringents qui se trouvent si fréquemment chez les bacilles ne représentent pas des spores véritables.

M. *Kitasato* a fait aussi quelques expériences sur l'immunité artificielle des cobayes, qu'il a obtenue non seulement après l'injection de cultures chauffées pendant une demi-heure à 80°, mais simplement après une dose d'une culture âgée de quinze jours. Les muscles des cobayes ainsi immunisés donnaient un bouillon dans lequel les bacilles poussaient aussi bien que dans du bouillon de cobayes ordinaires.

A la fin de son mémoire, M. *Kitasato* rapporte deux expériences, dans

lesquelles des cobayes nés de mères immunisées ont résisté à l'inoculation du charbon symptomatique virulent.

De tout le mémoire de M. *Kitasato* il résulte avec évidence que les travaux importants de MM. *Arloing*¹, qui le premier a fait des cultures; *Roux*², *Roux* et *Nocard*³ sur le charbon symptomatique, lui ont complètement échappé. Il y aurait vu que les cultures du *Bacillus Chaurari* ont été déjà obtenues dans du bouillon légèrement alcalin et en l'absence de l'air par M. *Roux*; il y aurait aussi trouvé que l'immunité des cobayes peut être obtenue même avec des cultures chauffées à 115°.

Je dois remarquer encore que les corps ovales réfringents doivent être considérés comme des spores indubitables, et que leur mort plus rapide sur des fils de soie ou dans des couches minces de muscles n'est nullement un argument contre cette opinion. Les faits recueillis par M. *Kitasato* prouvent seulement que les spores, dans des couches épaisses de viande, sont mieux protégées contre la destruction que dans les couches minces ou sur des fils de soie.

METCHNIKOFF.

À. HANAU. — Inoculation réussie du cancer. *Fortschritte der Medizin*, 1889, p. 321.

Toutes les recherches entreprises sur ce sujet, depuis celle de Langenbeck jusqu'à celles de Doutrelepoint, Koster, Schottelius et Kahlden, n'ont abouti qu'à des conclusions douteuses et qui ne pouvaient résister à une critique un peu approfondie.

Deux seuls expérimentateurs, dit l'auteur, ont obtenu des résultats dignes d'être pris en considération. Il s'agit des expériences de Novinsky⁴ et de celles de Wehr⁵. Ces deux auteurs pratiquèrent des inoculations sous-cutanées de chien à chien. Novinsky obtint deux fois (sur un grand nombre d'inoculations) le développement d'une tumeur au point inoculé. Cette tumeur fut reconnue histologiquement comme un carcinome. Dans l'un de ces deux cas, il y eut même une métastase ganglionnaire, qui fut de même reconnue, au moyen du microscope, comme étant de nature carcinomateuse. Quant à Wehr, il obtint des noyaux de structure carcinomateuse, mais qui disparurent spontanément au bout de quelque temps sans laisser de traces!

1. ARLOING, CORNEVIN et THOMAS. *Le charbon symptomatique*.
2. Ces *Annales*, 1887, p. 237.
3. Ces *Annales*, 1888, p. 50.
4. NOVINSKY. *Centralblatt der medicin. Wissenschaft*, 1876.
5. WEHR. Congrès des chirurgiens allemands de 1888.

La valeur des résultats obtenus par la transplantation de petits noyaux provenant d'un cancer en cuirasse sur des parties saines du thorax, faites par *Hahn*, a été à juste titre contestée par *Virchow*, puisqu'il ne s'agissait pas de noyaux cancéreux, mais de transplantations réussies de peau cancéreuse.

Parmi les rats blancs apprivoisés de l'Institut anatomo-pathologique de Zurich, qui tous descendaient de quatre individus, il s'était présenté déjà deux cas de cancroïde des organes génitaux externes. Un de ces animaux, une femelle agée, succomba dans la nuit du 27 au 28 novembre 1888. L'auteur avait fait ingérer à cet animal, 13 jours auparavant, une végétation ressemblant à l'*actinomyces*, sans examiner avec soin l'animal. La nécroscopie pratiquée le 28 fit constater sur la vulve une ulcération de la grandeur d'un franc, à bords renversés, assez indurés, et présentant des papilles en un point. Le fond de l'ulcération était inégal et présentait des masses nécrotiques. Une coupe pratiquée sur la masse ulcérée fit constater que l'ulcération reposait sur une tumeur blanc jaunâtre, d'un centimètre d'épaisseur, et de laquelle on pouvait, par le grattage, retirer du suc cancéreux. Dans la région inguinale droite, se trouvait une ulcération analogue, à bords décollés, qu'une coupe montra reposant sur une tumeur à épaisseur inégale. L'ensemble représentait un ganglion lymphatique ulcéré. Il y avait encore, dit l'auteur, une ganglion malade mais non ulcéré dans la région inguinale gauche, et un autre dans l'aisselle droite. Les autres organes étaient sains. Déjà, à la simple vue, le diagnostic de cancer avec métastase dans les aines et l'aisselle droite s'imposait.

L'examen histologique confirma absolument cette manière de voir : on trouva un cancer à lobes épidermiques.

L'auteur enleva du centre de chacun des ganglions non ulcérés un petit fragment. Ces fragments furent inoculés dans le scrotum de deux rats. Le scrotum fut incisé avec des ciseaux jusqu'à ce que le testicule devînt visible; puis la plaie fut suturée au catgut.

L'un des deux rats succomba le 14 janvier 1889. Il n'y avait rien à remarquer à un premier examen et l'auteur ne put retrouver la cicatrice de son incision. Sur le repli du canal déférent droit, il y avait quelques nodules translucides, de la grandeur d'une tête d'épingle ou d'un grain de millet. L'organe ressemblant à un épiploon et qui accompagne chez le rat les vaisseaux spermatiques internes, jusqu'au niveau de la région lombaire, présentait des deux côtés un grand nombre de noyaux blanchâtres, arrondis, formés de l'agglomération de nodules plus petits. Tout le grand épiploon était très épais et transformé en une masse de noyaux. Le plus gros de ces noyaux se trouvait vers le milieu du bord inférieur et présentait la grosseur d'une cerise. A la coupe,

la plus grosse tumeur présentait une couche superficielle, translucide, étroite, d'un gris clair et une partie centrale opaque, blanchâtre et donnant du suc cancéreux. Il y avait aussi des petites granulations sur ce petit épiploon, de même que sur la face inférieure du lobe gauche du foie, et entre l'estomac et la rate. Tous les autres organes étaient atrophiés, mais exempts de néo-formations.

L'examen histologique, pratiqué sur la plus grosse ainsi que sur l'une des petites granulations, permit de constater qu'il s'agissait d'un carcinome absolument identique à celui qui avait servi pour l'inoculation.

L'autre rat fut examiné le 26. Il présentait toutes les apparences d'une excellente santé. A la vue, on constata sur le côté droit du prépuce une ulcération de 1 centimètre de diamètre, à bords non décollés et non tuméfiés, et à fond lisse et propre. Sur le pénis, il y avait deux excroissances, de la grosseur d'un grain de millet, à surface lisse. Rien d'anormal du côté de la cicatrice scrotale, mais par la palpation, il fut aisément de trouver, au-dessous du testicule droit, une tumeur ayant un volume moitié moindre que celui du testicule lui-même. On fit l'autopsie de l'animal le 28. L'ulcération était recouverte d'une mince couche de pus. Les excroissances étaient des lobules glandulaires (glandes de Cooper). A l'examen microscopique, ces lobules glandulaires ne présentèrent aucune trace d'hyperplasie cellulaire. Sur le testicule il y avait deux tumeurs, l'une aplatie, blanchâtre, située sur le *gubernaculum hunteri* droit; une autre tumeur plus volumineuse, présentant 8 millimètres de long sur 3 à 4 millimètres de large, située sur la queue de l'épididyme, et développée sur la séreuse testiculaire, constituait la tumeur qu'on avait notée par la palpation à travers le scrotum.

Ce noyau se montre à la section, comme formé par la réunion de 4 noyaux plus petits, blanchâtres, finement granuleux et peu transparents. Tous les autres organes sont sains. L'animal est gras et bien nourri.

L'auteur a fait de nouvelles inoculations avec des parties provenant de cette tumeur. Les résultats seront communiqués plus tard.

La petite tumeur présentait à la surface une couche d'épithélium plat qui se transformait en une épaisse couche d'épithélium corné vers le bord, et le tout reposait sur un tissu conjonctif nettement papillaire. Dans les espaces interpapillaires, on voyait des trainées épithéliales qui contenaient des masses cellulaires, rangées concentriquement, et à cellules cornées vers le centre. La grosse tumeur était d'une façon très nette constituée histologiquement par un carcinome à globes épithéliaux.

L'auteur croit pouvoir conclure, des expériences que nous venons d'analyser, que le cancer est inoculable.

Il est certainement fort regrettable que les individus, sur lesquels ces expériences ont porté, appartiennent à une seule famille de rats, famille dans laquelle le cancer s'était montré spontanément déjà chez deux individus.

Le premier rat, celui sur lequel l'auteur prit des fragments pour inoculer les autres, avait servi quelque temps auparavant à une inoculation avec une végétation actinomycétique.

Il ne faut pas non plus oublier les communications de Volkman sur le cancer par la paraffine. Enfin l'introduction dans la vaginale de particules de tumeur ne peut-elle pas amener une espèce de greffe ? Une tumeur greffée, qui continue ensuite à se développer, n'est pas une tumeur inoculée. On pourrait dans ce cas appeler les résultats de l'auteur *greffe réussie d'une tumeur cancéreuse*, et cela n'est pas tout à fait la même chose qu'une inoculation réussie.

ISCOVESCO.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées mortes de la rage.

MOONS (Henri), 24 ans, d'Anvers, Belgique. Mordu le 2 mars 1887 par un chien reconnu enragé par M. Dell, vétérinaire, qui a observé l'animal vivant et a pratiqué l'autopsie. Moous a été mordu au genou droit, quatre morsures légères qui n'ont pas saigné, le pantalon a été déchiré ; à la face sur le côté droit du menton, au niveau du bord inférieur du maxillaire, une morsure ; à la lèvre inférieure, près de la commissure gauche, une morsure ; à la joue gauche, deux morsures fortes. Toutes les morsures de la face ont saigné, elles n'ont pas été cautérisées, un pansement a été fait par un médecin deux jours après.

Moons a été traité du 7 mars au 2 avril 1887.

Moons a succombé à la rage le 17 mai 1889.

M^{me} MAILLOT, née Colvez (Jacquette), 86 ans, de Coatascorn (Côtes-du-Nord). Mordue le 27 avril 1889 par un chien reconnu enragé à l'autopsie par M. Le Berre, vétérinaire à Lannion. Le bulbe de ce chien a été inoculé le 3 mai à un cobaye ; ce cobaye est devenu enragé le 15 mai. M^{me} Maillot a été mordue à la jambe droite, qui porte à la partie antérieure, au niveau du tiers inférieur, deux morsures très profondes, ayant beaucoup saigné. Ces morsures ont été cautérisées à l'alcali onze heures après qu'elles ont été faites.

M^{me} Maillot a été traitée du 3 mai au 17 mai.

Elle a été prise de rage paralytique le jeudi 30 mai et a succombé le 2 juin 1889.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — MAI 1889.

	A	B	C
Morsures à la tête { simples	» 2	» 2	» »
et à la figure { multiples	» 1	» 5	» 1
Cautérisations efficaces	» »	» 4	» »
— inefficaces	1	» 4	» »
Pas de cautérisation	2	» 2	» 1
Morsures aux mains { simples	» 3	» 50	» 5
et multiples	8	» 42	» 14
Cautérisations efficaces	» »	» 4	» 1
— inefficaces	3	» 30	» 8
Pas de cautérisation	8	» 64	» 10
Morsures aux membres et au tronc { simples	» 6	» 18	» 6
{ multiples	4	» 26	» 8
Cautérisations efficaces	2	» 7	» »
— inefficaces	5	» 17	» 5
Pas de cautérisation	3	» 20	» 9
Habits déchirés	10	» 38	» 12
Morsures à nu	» »	» 6	» 2
Morsures multiples en divers points du corps	» 4	» 6	» 2
Cautérisations efficaces	» »	» »	» »
— inefficaces	3	» 3	» 4
Pas de cautérisation	4	» 3	» 1
Habits déchirés	3	» 6	» 4
Morsures à nu	4	» 6	» 2
Totaux. { Français et Algériens	27	125	31
{ Etrangers	1	149	5
	A	B	C
TOTAL GÉNÉRAL		213	

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; La colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; La colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été :

Chiens, 192 fois; chats, 17 fois; ânes, 2 fois; mulet, 1 fois; homme, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

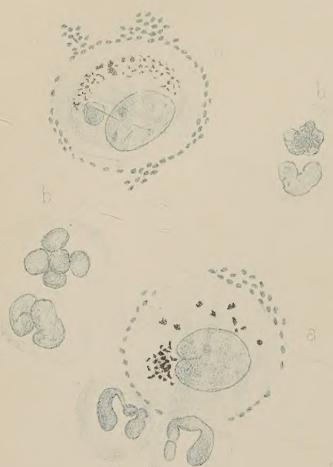


Fig. 1.

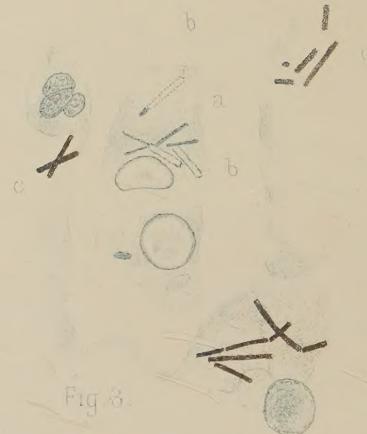


Fig. 3.



Fig. 2.



Fig. 4.

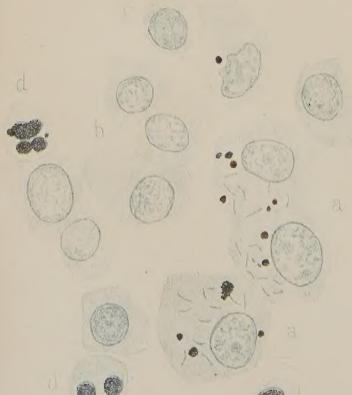


Fig. 5.

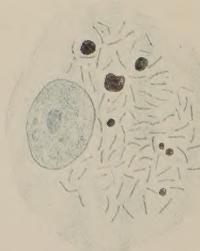


Fig. 6.



Fig. 7.

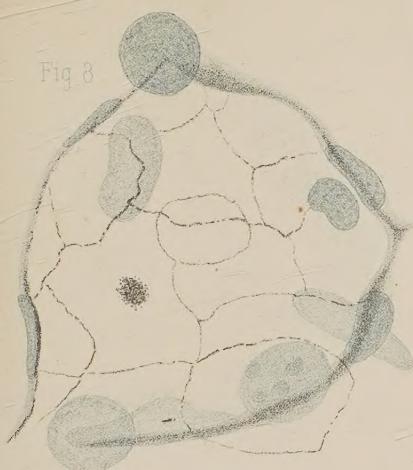


Fig. 10



